

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**“Biodisponibilidad y efecto  
antihipertensivo de quercetina”**

Tesis Doctoral para aspirar  
al Grado de Doctor que presenta la  
Licenciada D<sup>a</sup>. Pilar Galindo Gallardo

2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Pilar Galindo Gallardo  
D.L.: GR 2253-2012  
ISBN: 978-84-9028-142-0





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. Julio Gálvez Peralta, Profesor Titular y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada “Biodisponibilidad y efecto antihipertensivo de quercetina”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia y Diplomada en Nutrición Humana y Dietética D<sup>a</sup>. Pilar Galindo Gallardo, en los laboratorios de este Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 16 de Marzo de 2012.

Dr. Julio Gálvez Peralta





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. Juan Manuel Duarte Pérez y Dña. Rosario Jiménez Moleón, Catedrático y Profesora Titular respectivamente del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, como Directores,

Certifican: que la Tesis Doctoral titulada “Biodisponibilidad y efecto antihipertensivo de quercetina”, presentada por la Licenciado en Farmacia y Diplomada en Nutrición Humana y Dietética D<sup>a</sup>. Pilar Galindo Gallardo, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 16 de Marzo de 2012.

Dr. Juan Manuel Duarte Pérez

Dra. Rosario Jiménez Moleón



A mis padres.

A Juan.





“En la ciencia, el error no es una excepción. La ciencia funciona con el error. Un científico se está equivocando todo el día, y cuando no se equivoca igual le dan el nobel.”

Dr. Wagensberg

*Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino  
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.*

Antonio Machado



---

|                        |   |                                   |   |
|------------------------|---|-----------------------------------|---|
| <b>2K1C-GB</b>         | Ratas Goldblatt con estenosis unilateral de la arteria renal (2riñones-1clip) | <b>COMT</b>                       | Catecol-O-metil trasferasa                        |
| <b>ACh</b>             | Acetilcolina  | <b>COX</b>                        | Ciclooxigenasa                                    |
| <b>ADP</b>             | Adenosín difosfato  | <b>DETCA</b>                      | Dietilditiocarbamato                              |
| <b>Akt</b>             | Proteína quinasa B  | <b>DMSO</b>                       | Dimetilsulfóxido                                  |
| <b>AMP</b>             | Adenosín monofosfato  | <b>DNA</b>                        | Ácido desoxirribonucléico                         |
| <b>AMPK</b>            | Proteína quinasa dependiente de AMP   | <b>DOCA</b>                       | Acetato de deoxicorticosterona                    |
| <b>Ang-II</b>          | Angiotensina II   | <b>EDHF</b>                       | Factor hiperpolarizante dependiente del endotelio |
| <b>AP-1</b>            | Proteína activadora 1   | <b>ERK 1/2</b>                    | Quinasa reguladas por señales extracelulares 1/2  |
| <b>ATP</b>             | Adenosín trifosfato   | <b>ET-1</b>                       | Endotelina 1                                      |
| <b>BK<sub>Ca</sub></b> | Canales de potasio activados por calcio de conductancia larga                 | <b>eNOS</b>                       | Óxido nítrico sintasa endotelial                  |
| <b>βGluc</b>           | β-glucosidasas  | <b>GDP</b>                        | Guanosín difosfato                                |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b> | Calcio  | <b>GLUT</b>                       | Transportador intestinal de glucosa               |
| <b>cAMP</b>            | Adenosín monofosfato cíclico  | <b>GPx</b>                        | Glutación peroxidasa                              |
| <b>cGMP</b>            | Guanosín monofosfato cíclico  | <b>GTP</b>                        | Guanosín trifosfato                               |
| <b>CMLV</b>            | Células del músculo liso vascular   | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada)            |

|                        |  |                                  |  |
|------------------------|--|----------------------------------|--|
| <b>HDL</b>             | Lipoproteínas de alta densidad                                     | <b>LPS</b>                       | Lipopolisacárido   |
| <b>I3GA</b>            | Isorramnetina-3-O-glucurónido                                      | <b>M</b>                         | Molar  |
| <b>ICAM-1</b>          | Molécula de adhesión intercelular-1                                | <b>MAPKs</b>                     | Proteínas cinasas activadas por mitógeno                         |
| <b>IK<sub>Ca</sub></b> | Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia | <b>MCP-1</b>                     | Proteína quimiotáctica de monocitos 1                            |
| <b>IL</b>              | Interlukina  | <b>MDA</b>                       | Malonildialdehído  |
| <b>iNOS</b>            | Óxido nítrico sintasa inducible                                    | <b>MLCK</b>                      | Quinasa de cadenas ligeras de miosina                            |
| <b>ip</b>              | Vía intraperitoneal  | <b>MMPs</b>                      | Metaloproteinasas de matriz                                      |
| <b>IP<sub>3</sub></b>  | Inositol trifosfato  | <b>MRP</b>                       | Proteína de resistencia a múltiples fármacos                     |
| <b>IRS</b>             | Sustratos para el receptor de la insulina                          | <b>NAD(P)H</b>                   | Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato                          |
| <b>iv</b>              | Vía intravenosa  | <b>NFκB</b>                      | Factor de transcripción nuclear κ B                              |
| <b>JNK</b>             | Quinasa c-jun-NH <sub>2</sub> -terminal                            | <b>NO</b>                        | Óxido nítrico  |
| <b>K<sup>+</sup></b>   | Potasio  | <b>NOS</b>                       | Óxido nítrico sintasa  |
| <b>KCl</b>             | Cloruro potásico   | <b>NOXs</b>                      | Subunidades catalíticas membranales de la enzima NAD(P)H oxidasa |
| <b>LDL</b>             | Lipoproteínas de baja densidad                                     | <b>Nrf2</b>                      | Factor nuclear eritroide 2                                       |
| <b>L-NAME</b>          | L-nitro-arginina metil éster                                       | <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Anión superóxido   |

---

|             |   |                                |   |
|-------------|---|--------------------------------|---|
| <b>LPH</b>  | Lactasa floricina hidrolasa                   | <b>ROS</b>                     | Especies reactivas de oxígeno                                 |
| <b>PAM</b>  | Presión arterial media                        | <b>SAL</b>                     | Ácido sácara 1,4-lactona                                      |
| <b>PAS</b>  | Presión arterial sistólica                    | <b>SGLT1</b>                   | Transportador de glucosa sodio-dependiente                    |
| <b>PDEs</b> | Fosfodiesterasas                              | <b>SHR</b>                     | Rata espontáneamente hipertensa                               |
| <b>PDK</b>  | Proteína quinasa dependiente de fosfoinositol | <b>sICAM</b>                   | Molécula de adhesión intercelular soluble 1                   |
| <b>PGs</b>  | Prostaglandinas                               | <b>SIRT1</b>                   | Sirtuina 1  |
| <b>Phe</b>  | Fenilefrina                                   | <b>SK<sub>Ca</sub></b>         | Canales de potasio activados por calcio de conductancia lenta |
| <b>PI3K</b> | Fosfatidilinositol 3 quinasa                  | <b>SOD</b>                     | Superóxido dismutasa  |
| <b>PI3P</b> | Fosfatidilinositol 3 fosfato                  | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral $\alpha$                           |
| <b>PKC</b>  | Proteína quinasa C                            | <b>Tx</b>                      | Tromboxano  |
| <b>PON1</b> | Paraoxonasa/arilesterasa sérica 1             | <b>TxA2</b>                    | Tromboxano A2   |
| <b>PST</b>  | Enzima sulfotransferasa fenol                 | <b>UGT</b>                     | Enzima uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferasa           |
| <b>QUER</b> | Quercetina                                    | <b>VCAM-1</b>                  | Molécula de adhesión a células vasculares 1                   |
| <b>Q3GA</b> | Quercetin-3-O-Glucurónido                     | <b>VEGF</b>                    | Factor de crecimiento del endotelio vascular                  |
| <b>Q3'S</b> | Quercetin-3'-O-Sulfato                        | <b>vs</b>                      | Versus  |
| <b>RNA</b>  | Ácido ribonucleico                            | <b>XO</b>                      | Xantina oxidasa   |
| <b>OH</b>   | Grupo hidroxilo                               | <b>WKY</b>                     | Wistar Kyoto  |







## *Índice*

---



---

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b>  | 1  |
| <b>SUMMARY</b>  | 7  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | 13 |
| <b>1. Generalidades</b>   | 15 |
| <b>2. Flavonoides, endotelio y musculo liso vascular</b>  | 20 |
| <b>2.1. Efectos antioxidantes</b>   | 23 |
| <b>2.2. Efectos sobre el óxido nítrico</b>  | 24 |
| <b>2.3. Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado de endotelio</b>  | 27 |
| <b>2.4. Efectos sobre endotelina-1</b>  | 28 |
| <b>2.5. Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales y células musculares lisas vasculares</b> | 29 |
| <b>2.6. Efectos sobre la función endotelial en la hipertensión</b>  | 30 |
| <b>3. Flavonoides y plaquetas</b>   | 33 |
| <b>4. Flavonoides e hipertensión</b>  | 35 |
| <b>5. Flavonoides y aterosclerosis</b>  | 40 |
| <b>6. Flavonoides, obesidad y resistencia a la insulina</b>   | 43 |
| <b>6.1. Obesidad</b>  | 43 |
| <b>6.2. Resistencia a la insulina</b>   | 45 |
| <b>7. Flavonoides e isquemia cardíaca</b>   | 50 |
| <b>8. Flavonoides y accidente cerebrovascular</b>   | 52 |
| <b>9. Biodisponibilidad y metabolismo de quercetina</b>   | 56 |
| <b>9.1. Absorción</b>   | 57 |
| <b>9.2. Metabolismo</b>   | 58 |
| <b>9.3. Distribución</b>  | 60 |
| <b>9.4. Excreción</b>   | 62 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>   | 65  |
| <b>JUSTIFICATION AND AIMS</b>  | 73  |
| <b>ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN</b>  | 81  |
| <b>Artículo 1</b>  | 83  |
| <b>Artículo 2</b>  | 93  |
| <b>Artículo 3</b>  | 107 |
| <b>Artículo 4</b>  | 117 |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | 147 |
| <b>1. Ausencia de interacción sinérgica entre quercetina y catequina en el músculo liso vascular sistémico y pulmonar.</b> | 149 |
| a) Efectos sobre el tono vascular  | 150 |
| b) Efectos sobre la disfunción endotelial  | 151 |
| c) Efecto pro-oxidante   | 152 |
| <b>2. Desconjugación vascular de quercetina glucurónido: ¿la paradoja de los flavonoides revelada?</b>                     | 154 |
| a) Metabolismo de quercetina en un lecho vascular aislado y perfundido   | 155 |
| b) Efecto de la Q3GA sobre el tono vascular  | 156 |
| <b>3. La Q3GA disminuye la presión arterial en SHRs por desconjugación</b>   | 158 |
| a) Efecto antihipertensor agudo de los metabolitos plasmáticos de quercetina   | 159 |

---

|   |     |
|---|-----|
| b) Participación de las glucuronidasas en el efecto antihipertensor de la quercetina oral                       | 163 |
| 4. La quercetina origina diferentes efectos protectores cardiovasculares por vía oral o intraperitoneal en SHRs | 164 |
| a) Importancia de la pauta de administración de quercetina en su efecto antihipertensor crónico                 | 165 |
| b) Importancia de la vía de administración de quercetina en su efecto antihipertensor crónico                   | 166 |
| c) Relación entre vía de administración, metabolitos plasmáticos y actividad biológica de quercetina            | 169 |
| <br>  |     |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | 173 |
| <br>  |     |
| <b>CONCLUSIONS</b>  | 177 |
| <br>  |     |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | 181 |

---

| <b>FIGURAS</b>  | <b>Pag.</b> |
|---|-------------|
| <b>Figura 1.</b> Tendencia de las publicaciones que contienen la palabra quercetina en su resumen, en los últimos 30 años analizados a partir de datos del ISI Web of Science.  | 15          |
| <b>Figura 2.</b> Clasificación de los polifenoles.  | 17          |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química de los flavonoles más comunes.  | 18          |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química de los principales metabolitos plasmáticos de quercetina.   | 19          |
| <b>Figura 5.</b> Efecto vasodilatador directo de los flavonoides más representativos sobre la aorta aislada de rata.  | 21          |
| <b>Figura 6.</b> La quercetina protege al NO de la degradación inducida por el O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .  | 26          |
| <b>Figura 7.</b> Efectos antihipertensivos de la quercetina en ratas normotensas y en ratas espontáneamente hipertensas.  | 36          |
| <b>Figura 8.</b> Valores de presión arterial sistólica y niveles de insulina en plasma en la descendencia de los ratos alimentados con una dieta control, una dieta rica en grasa o un dieta rica en grasa suplementada con quercetina. | 38          |
| <b>Figura 9.</b> Estudios prospectivos de cohortes sobre los flavonoides y la enfermedad coronaria.   | 52          |
| <b>Figura 10.</b> Absorción, distribución, metabolismo y excreción de la quercetina procedente de la dieta tras la ingestión oral.  | 56          |
| <b>Figura 11.</b> Vías de transporte y metabolización de la quercetina procedente de la dieta, en el lumen y en el interior de los enterocitos del tracto digestivo.  | 58          |

**Figura 12.** Formación de la quercetina aglicona a partir de su metabolito glucuronizado, Q3GA, por acción de las enzimas  $\beta$ -glucuronidasas en las células del músculo liso y sus posibles mecanismos involucrados en la producción de la vasodilatación vascular. 161

**Figura 13.** Mecanismo de activación y acción de la NAD(P)H oxidasa vascular. 169

## **TABLAS**

**Tabla 1.** Principales avances en la investigación de los flavonoles en el área cardiovascular. 16

*Resumen*

---





En esta tesis doctoral se han desarrollado los siguientes puntos:

- 1) Determinar si existe una interacción entre quercetina y catequina con influencia en la prevención de la disfunción endotelial *in vitro* y los posibles mecanismos implicados.

Para llevar a cabo este primer punto, hemos analizado las interacciones entre el flavonol quercetina y el flavan-3-ol (+)-catequina, dos de los flavonoides más abundantes en la dieta, sobre la función vascular a través del empleo de los dos compuestos puros y diferentes mezclas de estos dos flavonoides en proporción 1:0,1, 1:1 y 1:10. La quercetina indujo un efecto relajante dependiente de la concentración más potente que la catequina en la aorta aislada de rata, y el análisis isoblográfico de las mezclas no mostró efectos sinérgicos o antagónicos entre ellos, es decir, sus efectos son aditivos. La quercetina fue más potente en las arterias mesentéricas que en las pulmonares, mientras que la catequina tuvo efectos débiles en estos vasos y no modificó los efectos producidos por la quercetina. La disfunción endotelial basada únicamente en un incremento del estrés oxidativo, al impedir la degradación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) endógeno, mediante la inhibición de la superóxido dismutasa (SOD) con dietilditiocarbamato (DETCA), fue prevenido por la quercetina, mientras que la catequina mostró un efecto más débil y la mezcla 1:1 un efecto intermedio en comparación con los compuestos puros. La quercetina, pero no la catequina, mostró un efecto pro-oxidante y escavenger de óxido nítrico (NO), los cuales no fueron prevenidos por la presencia de catequina. En conclusión, la catequina fue menos potente que la quercetina como vasodilatador, pro-oxidante o previniendo la disfunción endotelial, y no existieron interacciones sinérgicas entre ambos flavonoides.

- 2) Analizar los efectos *in vitro* de los principales metabolitos conjugados de quercetina sobre el tono de las arterias de resistencia, así como determinar su patrón cinético en plasma tras su administración intravenosa y su correlación con el efecto *in vivo*

sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHRs, *spontaneously hypertensive rats*).

El flavonoide quercetina, presente en la dieta, ejerce efectos cardiovasculares protectores. Debido a que la quercetina se metaboliza rápidamente en metabolitos glucuronizados menos activos o inactivos, y las concentraciones plasmáticas de quercetina libre son muy bajas, una enorme cantidad de datos científicos generados a lo largo de décadas con los compuestos conjugados *in vitro* han sido cuestionados. El objetivo en esta Tesis Doctoral fue determinar si el glucurónido de quercetina puede desconjugarse *in situ* y si esta desconjugación conduce a un efecto biológico. La quercetina y la quercetina 3-glucurónido (Q3GA) fueron perfundidos a través del lecho vascular mesentérico aislado de rata. La quercetina fue metabolizada rápidamente en el mesenterio. Sin embargo, la descomposición de la Q3GA fue más lenta y estuvo acompañada por un aumento progresivo de la cantidad de quercetina en el líquido perfundido y en el tejido durante las 6 horas del experimento, lo cual fue prevenido por el inhibidor selectivo de  $\beta$ -glucuronidasas (SAL, *saccharic acid 1,4-lactone* o *D-saccharolactone*). La incubación de anillos de arterias mesentéricas, montados en un miógrafo de alambres, con la Q3GA durante 1 hora o más, resultó en una inhibición significativa de la respuesta contráctil que de nuevo fue impedido por el inhibidor SAL. Además, la administración intravenosa (iv) de Q3GA produjo un descenso lento, pero progresivo y sostenido de la presión arterial, lo que demuestra por primera vez que la Q3GA tiene efectos *in vivo*. Con este estudio concluimos que la Q3GA se comporta como un transportador de la quercetina en el plasma, la cual se desconjugaría *in situ* produciendo la liberación de la aglicona, que es la efectora final.

Además se conoce que la administración oral crónica de quercetina reduce la presión arterial y restaura la disfunción endotelial en animales hipertensos. Sin embargo, la quercetina (aglicona) normalmente no está presente en el plasma, ya que se metaboliza rápidamente hacia metabolitos conjugados, la mayoría menos activos. El

objetivo de este segundo estudio, dentro de este mismo punto, fue analizar si la desconjugación de estos metabolitos está implicada en el efecto hipotensor de la quercetina. Por ello, analizamos los efectos sobre la presión arterial y la función vascular *in vitro* de los metabolitos conjugados de quercetina (Q3GA; isorramnetina-3-glucurónido, I3GA, y quercetina-3'-sulfato, Q3'S) en SHR. La administración iv de los metabolitos Q3GA e I3GA (1 mg/kg), pero no la de Q3'S, redujeron progresivamente la presión arterial media (PAM), determinada en SHR conscientes. El efecto hipotensor de Q3GA se suprimió en los animales hipertensos tratados previamente con el inhibidor específico de las  $\beta$ -glucuronidasas (SAL, 10 mg/ml). En las arterias mesentéricas, a diferencia de la quercetina, la Q3GA no tuvo un efecto inhibitorio en la respuesta contráctil a fenilefrina después de 30 minutos de incubación. Sin embargo, después de 1 hora de incubación, la Q3GA reduce fuertemente esta respuesta, la cual fue prevenida por la incubación previa con el inhibidor SAL. La administración oral de quercetina (10 mg/kg) produjo una disminución progresiva de la PAM. También observamos que dicho efecto hipotensor desaparece en las SHR tratadas previamente con el SAL. Por tanto, podemos concluir que los metabolitos conjugados están implicados en el efecto antihipertensivo *in vivo* de quercetina, actuando como moléculas para el transporte plasmático de quercetina hacia los tejidos diana. La quercetina liberada desde sus metabolitos glucuronizados podría ser la responsable de su efecto vasorelajante e hipotensor.

- 3) Determinar si la pauta de administración de la quercetina (dosis única diaria, dosis dividida en dos tomas diarias o administrada por vía intraperitoneal (ip)) modifica el perfil de biodisponibilidad y el metabolismo en SHR y determinar la correlación entre el perfil farmacocinético y la actividad sobre la función endotelial y la presión arterial.

Para llevar a cabo este objetivo empleamos SHR, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos experimentales: (1) 1 ml de metilcelulosa (MC) al 1%

administrada por sonda oral y 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) por vía ip (grupo control), (2) 10 mg/kg de quercetina administrada por sonda oral y 2% de DMSO administrada por vía ip, (3) 10 mg/kg de quercetina administrada por sonda oral dividida en dos dosis diarias (5 + 5 en intervalos de 12 horas) y 2% de DMSO administrada por vía ip, y (4) 1 ml de MC al 1% administrada por sonda oral y 10 mg/kg de quercetina administrada por vía ip. Las ratas se trataron diariamente durante 5 semanas. El tratamiento crónico oral con una y dos dosis diarias, fueron igualmente eficaces al final del mismo, tanto en la restauración de la vasodilatación dependiente del endotelio, previamente alterada, y en la reducción de la respuesta contráctil a fenilefrina en arterias mesentéricas, como en la reducción de la presión arterial sistólica, de la frecuencia cardíaca y de la hipertrofia cardíaca y renal. También se observó en los grupos tratados por vía oral, una disminución en la producción de  $O_2^-$  inducida por la nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NAD(P)H, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidasa vascular. La administración ip redujo, en menor medida que la administración oral, el aumento de la presión arterial sistólica, y no tuvo efectos sobre la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular. Sin embargo, niveles más altos de metabolitos fueron cuantificados tras la administración ip en comparación con la oral, en cualquier tiempo estudiado, a excepción de los niveles plasmáticos de la aglicona de quercetina metilada que fue mayor en la administración oral en comparación con la administración ip a las 2 horas, pero no a las 8 horas. Así, podemos concluir que la quercetina administrada oralmente fue superior a la administrada ip, en cuanto a la protección frente a las complicaciones cardiovasculares en SHR. Pero no se encontraron diferencias entre la administración oral de una única dosis diaria o la dividida en dos tomas diarias.

*Summary*

---



In this Ph. D. Thesis have developed the following points:

- 1) To analyze the interaction between quercetin and catechin, the representative compounds of the two major classes of flavonoids, on the prevention of endothelial dysfunction *in vitro* and, if so to determine the involved mechanisms.

To accomplish this first point, we have analyzed the interactions between these two flavonoids on vascular function using two pure compounds and mixtures of these flavonoids in 1:0.1, 1:1 or 1:10 proportions. Quercetin induced a more potent concentration-dependent relaxant effect than catechin in the isolated rat aorta, and the isobolographic analysis of the mixtures showed no synergistic or antagonistic effects between them, i.e. their effects were additive. Quercetin was more potent in mesenteric than in pulmonary arteries. Catechin had weak effects in these vessels and did not modify the effects of quercetin. Endothelial dysfunction induced by increased oxidative stress by the superoxide dismutase (SOD) inhibitor diethyldithiocarbamate (DETCA) was prevented by quercetin, whereas catechin showed a weak effect and the 1:1 mixture an intermediate effect compared with the pure compounds. Quercetin but not catechin showed a pro-oxidant and nitric oxide (NO)-scavenging effect, which was not prevented by catechin. In conclusion, catechin was less potent than quercetin as a vasodilator, pro-oxidant or to prevent endothelial dysfunction, and there were no synergistic interactions between quercetin and catechin.

- 2) To analyze the *in vitro* effects of the major conjugated metabolites of quercetin on the tone of mesenteric resistance arteries and also to determine its kinetic pattern in plasma after intravenous (iv) administration and its correlation with the *in vivo* effect on blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHRs).

The dietary flavonoid quercetin exerts protective cardiovascular effects. Because quercetin is rapidly metabolized into less active or inactive glucuronidated metabolites



and the plasma concentrations of free quercetin are very low, a huge amount of scientific data generated along decades with the unconjugated compounds *in vitro* has been questioned. We aimed to determine whether glucuronidated quercetin can deconjugate *in situ* and whether deconjugation leads to a biological effect. Quercetin and quercetin-3-glucuronide (Q3GA) were perfused through the isolated rat mesenteric vascular bed. Quercetin was rapidly metabolized in the mesentery. In contrast, the decay of Q3GA was slower and was accompanied by a progressive increase of quercetin in the perfusate and in the tissue over 6 h which was prevented by the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor saccharolactone or saccharic acid 1,4-lactone (SAL). Incubation of mesenteric arterial rings mounted in a wire myograph with Q3GA for  $\geq 1$  h resulted in a significant inhibition of the contractile response which again was prevented by SAL. Moreover, the iv administration of Q3GA resulted in a slow onset and sustained blood pressure lowering effect, demonstrating for the first time that Q3GA has effects *in vivo*. So, we propose that Q3GA behaves as a quercetin carrier in plasma which deconjugates *in situ* releasing the aglycone which is the final effector.

Moreover, we know that chronic oral quercetin reduces blood pressure and restores endothelial dysfunction in hypertensive animals. However, quercetin (aglycone) is usually not present in plasma, because it is rapidly metabolized into conjugated, mostly inactive, metabolites. The aim of this second study, inside this point, was to analyze whether deconjugation of these metabolites is involved in the blood pressure lowering effect of quercetin. We have analyzed the effects on blood pressure and vascular function *in vitro* of the conjugated metabolites of quercetin (Q3GA; isorhamnetin-3-glucuronide, I3GA; and quercetin-3'-sulfate, Q3'S) in SHR. Iv administration of Q3GA and I3GA (1 mg/kg), but not Q3'S, progressively reduced mean blood pressure (MBP), measured in conscious SHRs. The hypotensive effect of Q3GA was abolished in SHRs treated with the specific inhibitor of  $\beta$ -glucuronidase (SAL, 10 mg/ml). In mesenteric arteries, unlike quercetin, Q3GA had no inhibitory

effect in the contractile response to phenylephrine after 30 min of incubation. However, after 1 hour of incubation Q3GA strongly reduced this contractile response and this effect was prevented by SAL. Oral administration of quercetin (10 mg/Kg) induced a progressive decrease in MBP, which was also suppressed by SAL. Conjugated metabolites are involved in the *in vivo* antihypertensive effect of quercetin, acting as molecules for the plasmatic transport of quercetin to the target tissues. Quercetin released from its glucuronidated metabolites could be responsible for its vasorelaxant and hypotensive effect.

- 3) To analyze whether different dosage regimens of quercetin (one or two daily oral doses or one intraperitoneal dose (ip)) modify the bioavailability and metabolite profile in SHRs and also to determine the correlation between the pharmacokinetic profile and the activity on endothelial function and blood pressure.

To carry out this objective we use SHRs, which were randomly assigned to four experimental treatments: (1) 1 mL of 1% methylcellulose (MC) by oral gavage and 2% dimethylsulfoxide (DMSO) ip (control group) (2) 10 mg/kg quercetin by oral gavage once daily and 2% DMSO ip (3) 10 mg/kg quercetin by oral gavage divided in two daily doses (5+5 at 12 h intervals) and 2% DMSO ip (4) 1 mL of 1% MC by oral gavage and 10 mg/kg quercetin ip injection. Rats were treated daily for 5 weeks. Single dose and two daily doses, in a long-term oral treatment were equally efficient, both restoring the impaired aortic endothelium-dependent vasodilatation and reducing mesenteric contractile response to phenylephrine, systolic blood pressure, heart rate and heart and kidney hypertrophy. Attenuation of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase-driven superoxide anion ( $O_2^-$ ) production was also found in orally treated rats. Intraperitoneal administration reduced in lesser extent than oral administration the increased systolic blood pressure, being without effect in endothelial dysfunction and vascular oxidative stress. In contrast, greater levels of metabolites were quantified following ip compared to oral administration at

## *Summary*

---

any time point, except for higher plasma methylated quercetin aglycone in oral as compared to ip administration at 2 but not at 8 h. In conclusion, oral quercetin was superior to ip administration to protect cardiovascular complications in SHRs. No differences were found between the oral administrations as a single daily dose or divided into two daily doses.

## *Introducción*

---



## 1. Generalidades de los flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos en 1930s e inicialmente considerados como vitaminas (se les denominó “vitamina P”) por sus efectos en la permeabilidad capilar (Rusznyak y Szent-Györgyi, 1936). El interés en estos componentes decayó, tras demostrar que no eran requeridos como micronutrientes para la salud humana, en los años 40 (Joint-Committee-Nomenclature-ASBC-AIN, 1950). Sin embargo, una gran expansión de este campo se llevó a cabo mucho más tarde, en los años 90, debido a la publicación de varios estudios epidemiológicos que demostraron una correlación inversa entre el consumo diario de flavonoides, y las tasas de incidencia y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1996; Keli *et al.*, 1996; Geleijnse *et al.*, 2002). Hoy en día, más de 30.000 estudios han sido publicados sobre los flavonoides y más de 10.000 tratan sobre uno sólo de ellos: la quercetina (figura 1). Los mayores progresos en la investigación sobre los flavonoles en el área cardiovascular se resumen en la Tabla 1.

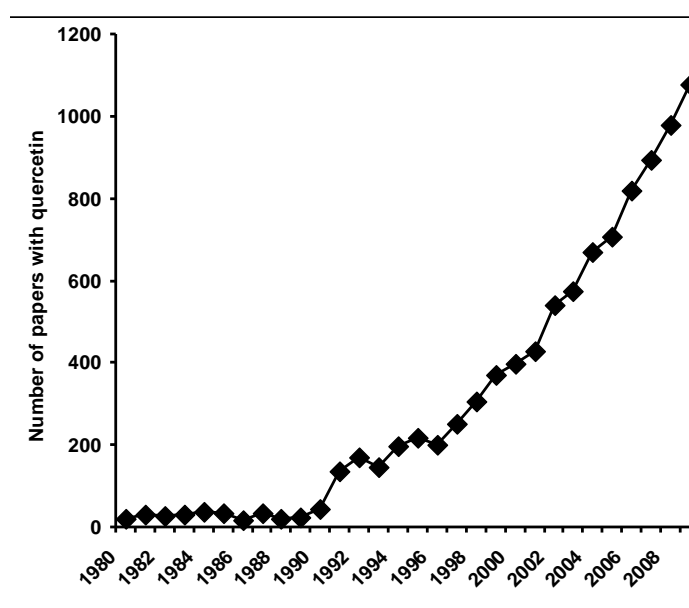


Figura 1. Tendencia de las publicaciones que contienen la palabra "quercetina" en su resumen, en los últimos 30 años, analizadas a partir de datos del ISI Web of Science.

**Tabla 1. Principales avances en la investigación de los flavonoles en el área cardiovascular.**

|   | Referencias bibliográficas   |
|---|--|
| Discovery of flavonols and effects on capillary permeability                        | (Rusznayk y Szent-Györgyi, 1936)                                     |
| Platelet antiaggregant effects of quercetin   | (Beretz <i>et al.</i> , 1982)  |
| Flavonols inhibit NADPH oxidase and scavenge superoxide                             | (Tauber <i>et al.</i> , 1984) (Busse <i>et al.</i> , 1984)           |
| Quercetin prevents oxidized-LDL cytotoxicity  | (Negre-Salvayre y Salvayre, 1992)                                    |
| Inverse association between flavonol and flavone intake with coronary heart disease | (Hertog <i>et al.</i> , 1993)  |
| Quercetin and wine polyphenols inhibit LDL oxidation                                | (Frankel <i>et al.</i> , 1993)                                       |
| Vasodilator effects of quercetin  | (Duarte <i>et al.</i> , 1993a)<br>(Fitzpatrick <i>et al.</i> , 1993) |
| Inverse association between flavonol and flavone intake with stroke                 | (Keli <i>et al.</i> , 1996)  |
| Antiatherosclerotic effects of wine polyphenols and quercetin                       | (Hayek <i>et al.</i> , 1997)   |
| Meta-analysis of epidemiological studies in coronary disease                        | (Huxley y Neil, 2003)  |
| Antihypertensive effects of quercetin   | (Duarte <i>et al.</i> , 2001b)                                       |
| Quercetin and other polyphenolics activate sirtuins                                 | (Howitz <i>et al.</i> , 2003)  |
| Antihypertensive effects of quercetin in humans                                     | (Edwards <i>et al.</i> , 2007)                                       |
| Meta-analysis of epidemiological studies with flavonols and stroke                  | (Hollman <i>et al.</i> , 2010)                                       |

Los flavonoides constituyen una gran clase de polifenoles encontrados en las plantas. Concretamente son sustancias producidas como metabolitos secundarios por las plantas, donde ejercen diversas funciones como antifúngicos, bactericidas, quelantes de metales, protectores de radiación ultravioleta, colorantes y controladores de las auxinas reguladoras del crecimiento y de la diferenciación en los vegetales, cuyo elemento estructural común es que todas poseen un esqueleto de difenilpirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos fenilo ligados a través de un anillo de pirano (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Sobre este esqueleto pueden darse miles de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalconas (figura 2).

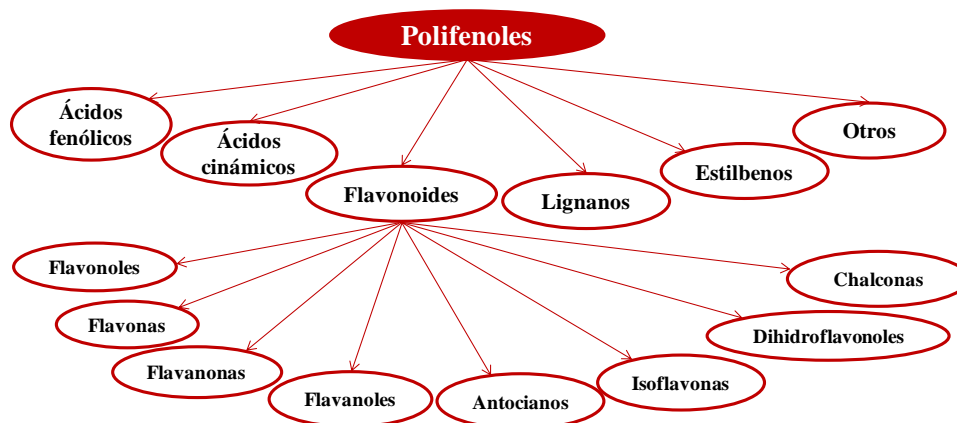


Figura 2. Clasificación de los polifenoles.

Entre los flavonoides, los flavonoles (junto con los flavanoles) son los más abundantes y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los flavonoles están presentes, normalmente como diversos glucósidos, en cantidades considerables en nuestra dieta normal. A pesar de que los flavonoles pueden encontrarse prácticamente en casi todos los vegetales y las frutas, las fuentes más ricas son la cebolla, la lechuga, el repollo, el brócoli, las judías, los guisantes, la manzana, la sidra, la uva, el vino y el té. Todos ellos derivan de la 3-hidroxi-flavona, que es el flavonol más simple. La quercetina es el flavonol prototipo, el más abundante en las plantas y el mejor estudiado. Otros flavonoles comunes son el kaenferol, la miricetina, la isorramnetina, la tamarixetina, la morina y la fisetina (figura 3). El kaenferol y la miricetina están también presentes en muchos alimentos. La isorramnetina y la tamarixetina son metabolitos metilados de la quercetina y se encuentran normalmente en el plasma o en los tejidos, tras el consumo de quercetina. La ingesta diaria de flavonoles ha sido estimada sobre 20-35 mg/día, de los cuales el 65% corresponden con la quercetina y sus glucósidos, siendo las principales fuentes de flavonoles las cebollas (350-1200 mg/kg), la col rizada, el puerro y los tomates cherrys (Hertog *et al.*, 1996). La biodisponibilidad de quercetina depende de la naturaleza del azúcar adjunto a ella y de los componentes de la matriz de los alimentos (etanol, grasa, emulsionantes,...), los cuales pueden



afectar a su solubilidad. Por ejemplo, el consumo de cebollas conduce a niveles plasmáticos más elevados de quercetina que otras fuentes alimenticias (Davalos *et al.*, 2006). Los glucósidos existentes en las cebollas son fuentes de quercetina con mayor biodisponibilidad, que los aglicones administrados como compuesto puro (Hollman *et al.*, 1995). Sin embargo, cuando una fuente alimenticia rica en glucósidos (por ejemplo, la carne de la chalota) fue comparada con una rica en aglicones (la piel seca de la chalota), ésta última dio un mayor nivel plasmático de quercetina, indicando que la matriz del alimento es un factor clave para la biodisponibilidad de la quercetina (Wiczowski *et al.*, 2008).

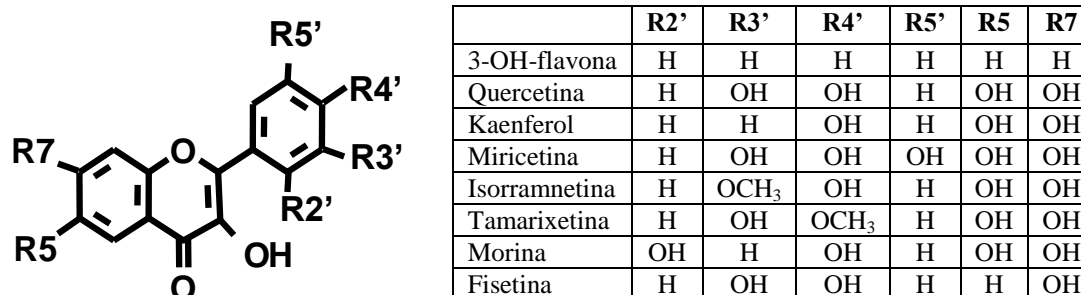


Figura 3. Estructura química de los flavonoles más comunes.

Los flavonoles muestran una amplia gama de actividades biológicas, siendo los compuestos más activos dentro del grupo de los flavonoides. Por lo tanto, los efectos beneficiosos de las dietas ricas en frutas y verduras, sobre la salud cardiovascular, han sido a menudo atribuidos a los flavonoides, en general, y a los flavonoles, más concretamente. Los flavonoles son comercializados como suplementos dietéticos, en forma de compuestos puros (quercetina), de mezclas de flavonoides o como extractos, normalmente a dosis que exceden en gran medida la ingesta dietética diaria. Algunos flavonoides también se utilizan como drogas venotónicas para el tratamiento de varias enfermedades venosas (Lyseng-Williamson y Perry, 2003).

En la introducción de esta Tesis Doctoral, se pretende hacer una revisión sobre el continuo crecimiento de las evidencias que apoyan el papel beneficioso de los flavonoles en las enfermedades cardiovasculares y las potenciales dianas moleculares involucradas. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con la quercetina, aunque los datos disponibles indican unos efectos biológicos similares cualitativamente para el kaenferol, la isorramnetina y la tamarixetina. La miricetina comparte con otros flavonoles algunas de sus acciones, pero puede presentar diferencias e incluso, algunas veces, efectos opuestos. Una cuestión interesante, que ha sido el centro de atención en los últimos años, es si las observaciones realizadas *in vitro* con la quercetina y otros flavonoides, tienen alguna relevancia *in vivo*. La actividad biológica de los flavonoides ha sido analizada usando compuestos aglicones disponibles comercialmente (no glicosilados) que están presentes en muy bajas concentraciones en plasma (Kroon *et al.*, 2004). La quercetina es rápidamente sulfatada y/o conjugada con el ácido glucurónico durante el metabolismo de primer paso (intestino-hígado) y una porción de dichos metabolitos son también metilados; por lo tanto, los metabolitos de quercetina que se encuentran en mayor proporción en el plasma humano son la Q3GA, la Q3'S y la I3GA (figura 4) (Day *et al.*, 2001).

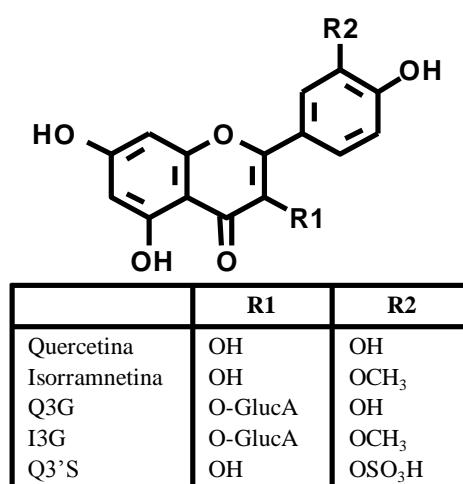


Figura 4. Estructura química de los principales metabolitos plasmáticos de quercetina.

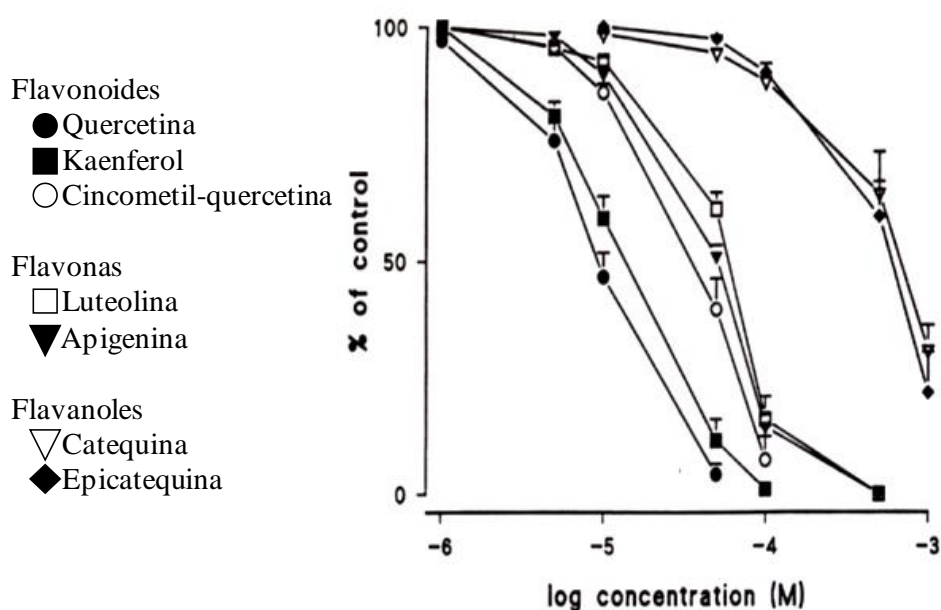
La información disponible sobre los efectos *in vitro* de estos metabolitos es limitada. En general, estos metabolitos son menos activos que los componentes de origen y, algunas veces, totalmente inactivos. Sin embargo, también es cada vez más evidente que los metabolitos conjugados pueden ser desconjugados por enzimas  $\beta$ -glucuronidasas y dichos flavonoles libres pueden acumularse en los tejidos (Bieger *et al.*, 2008). Hay algunas evidencias indirectas relativas a la dependencia de los glucurónidos de quercetina a ser desconjugados, para ejercer sus efectos (Lee-Hilz *et al.*, 2008).

## **2. Flavonoides, endotelio y músculo liso vascular**

El endotelio vascular ejerce un importante control en la homeostasis cardiovascular. El equilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores, factores protrombóticos y antitrombóticos, y factores proliferativos y antiproliferativos está desplazado en las enfermedades cardiovasculares, lo cual conduce a hipertensión, aterosclerosis, agregación plaquetaria e isquemia. La disfunción endotelial está caracterizada por un deterioro en la vasodilatación dependiente del endotelio, la reducción de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS, *nitric oxide synthase*) y un estado protrombótico y proinflamatorio de las células endoteliales. Esta alteración en la función endotelial es un marcador precoz e independiente de mal pronóstico en la mayoría de las formas de enfermedad cardiovascular (Schachinger *et al.*, 2000; Widlansky *et al.*, 2003).

Los efectos de la quercetina y demás flavonoides relacionados, sobre la modulación de la función y la disfunción endotelial han sido ampliamente estudiados (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2006b). La quercetina ejerce directamente efectos vasodilatadores agudos en aorta aislada de rata (Duarte *et al.*, 1993a; Duarte *et al.*,

1993b; Fitzpatrick *et al.*, 1993) (figura 5). En vasos sanos, estos efectos son independientes del endotelio y se producen de manera similar, aunque con diferente potencia, en aortas contraídas con diferentes estímulos (noradrenalina, cloruro potásico (KCl), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, *phorbol 12-myristate 13-acetate*), altas concentraciones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), etc). Curiosamente, la quercetina y sus metabolitos metilados son más potentes en las arterias coronarias (Ibarra *et al.*, 2002) y en las arterias de resistencia, que en los vasos de conductancia (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002). También son más potentes vasodilatadores en las arterias de animales hipertensos que en las de animales normotensos (Ibarra *et al.*, 2003). Los mecanismos moleculares involucrados podrían estar relacionados con la inhibición de diferentes proteínas quinasa como la quinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK, *myosin light chain kinase*) y la proteína quinasa C (PKC, *protein kinase C*).



**Figura 5.** Efecto vasodilatador directo de los flavonoides más representativos sobre la aorta aislada de rata. Muestra una mayor potencia para los flavonoides, seguidos de las flavonas y los flavanoles. Gráfica tomada de Duarte *et al.*, 1993b.

Algunos flavonoides aislados, especialmente la delphinidina (perteneciente al grupo de las antocianidinas) (Andriambelison *et al.*, 1998) y la crisina (perteneciente al grupo de las flavonas) (Duarte *et al.*, 2001a), originan relajaciones dependientes del endotelio y del NO. Estos efectos dependientes del endotelio están relacionados con un efecto pro-oxidante, ya que pueden ser inhibidos por las enzimas SOD y catalasa, que elevaría los niveles intracelulares del  $O_2^-$ , con el consiguiente aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  endotelial citosólico (Andriambelison *et al.*, 1998). Algunos grupos han descrito también que los efectos de la quercetina son parcialmente dependientes del endotelio y están relacionados con la liberación de factores de relajación derivados de dicho endotelio (Ajay *et al.*, 2003; Khoo *et al.*, 2010). Estos factores se liberan del endotelio en respuesta al agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) generada por la quercetina, por un mecanismo pro-oxidante (Khoo *et al.*, 2010). También hemos observado un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) mediado por la quercetina en arterias coronarias de rata (Cogolludo *et al.*, 2007). La producción de ROS puede ser consecuencia de la auto-oxidación de la quercetina en el medio de incubación o por un evento específico que ocurre en las células vasculares. Sin embargo, no hemos observado hasta el momento que la quercetina produzca relajación dependiente del endotelio en las diferentes arterias estudiadas; observación consistente con los datos recientes de otros grupos (Suri *et al.*, 2010). Además los metabolitos glucuronizados y sulfatados de quercetina carecen de efecto vasodilatador directo en la aorta de rata (Lodi *et al.*, 2009). Sin embargo, en arteria coronaria de cerdo, la Q3'S inhibe la contracción inducida por la endotelina 1 (ET-1) y por el análogo del tromboxano A2 ( $TxA_2$ ), U-46619, de forma independiente del endotelio, mientras que la Q3GA es inactiva (Suri *et al.*, 2010). En contraste con la quercetina y otros flavonoides, la miricetina puede inducir una repuesta contráctil dependiente del endotelio a través de un aumento en los metabolitos vasoconstrictores derivados de la ciclooxigenasa (COX) (Jiménez *et al.*, 1999).

## 2.1. Efectos antioxidantes

Los efectos beneficiosos de los flavonoides suelen atribuirse generalmente a su gran capacidad antioxidante. La quercetina y otros flavonoides son potentes captadores de ROS, como el  $O_2^-$ , grupos hidroxilo ( $OH^-$ ) y  $H_2O_2$ , a concentraciones micromolares (Ozgová *et al.*, 2003). También se ha demostrado que los glucurónidos de quercetina tienen propiedades antioxidantes (Moon *et al.*, 2001). Pero aparte de estas propiedades como scavenger de ROS, los flavonoides son capaces de inhibir numerosas enzimas generadoras de estas especies reactivas, lo que puede ser aún más importante. Entre éstas se incluyen la xantina oxidasa (XO) (Chang *et al.*, 1993), la COX (Ferrándiz y Alcaraz, 1991), la lipooxigenasa (Rice-Evans *et al.*, 1996) y la NAD(P)H oxidasa existente en la membrana de neutrófilos (Tauber *et al.*, 1984) y en las células del músculo liso vascular (CMLV) (Lodi *et al.*, 2006). También pueden estimular otras enzimas con capacidad antioxidante, como la catalasa y la SOD (Sudheesh *et al.*, 1999). Al disminuir las concentraciones celulares de  $O_2^-$  a través de estos mecanismos, los flavonoides protegen al NO y aumentan su actividad biológica.

Sin embargo, los flavonoides también pueden ser pro-oxidantes (“paradoja de la quercetina”) (Boots *et al.*, 2007). La quercetina puede auto-oxidarse en soluciones acuosas y generar radicales libres (López-López *et al.*, 2004), además de disminuir los niveles de tioles intracelulares, como el glutatión (Boots *et al.*, 2003). Pero este efecto pro-oxidante puede ser paradójicamente beneficioso, ya que podría jugar un papel positivo en la disfunción endotelial, porque la generación de  $O_2^-$  en las células endoteliales puede estimular la señal del  $Ca^{2+}$  y aumentar así la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) y la liberación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) (Duarte *et al.*, 2004).

## 2.2 Efectos sobre el óxido nítrico

Las acciones de la quercetina sobre el NO son muy complejas y las condiciones del estrés oxidativo influyen fuertemente en su resultado. En los sistemas libres de células, la quercetina puede ser oxidada por el oxígeno y generar  $O_2^-$ , el cual reacciona rápidamente con el NO inactivándolo (López-López *et al.*, 2004), un efecto que no es compartido por los metabolitos glucuronizados y sulfatados de la quercetina (Lodi *et al.*, 2008). En las células endoteliales de aorta bovina, en ausencia de estrés oxidativo, se ha demostrado que la quercetina provoca un incremento rápido de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico, así como una estimulación, dependiente de la dosis y del tiempo, de la fosforilación de la eNOS (Ser<sup>1179</sup>), con un aumento concomitante en la producción de NO medido por quimioluminiscencia (Khoo *et al.*, 2010). Por el contrario, Jackson y Venema describen efectos inhibitorios sobre la actividad de la eNOS inducidos por quercetina en este mismo tipo celular (Jackson y Venema, 2006). También se ha observado que cuando la producción de NO se determina por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, la quercetina tampoco aumenta el NO en dichas células endoteliales (Stoclet *et al.*, 1999).

Por el contrario, en condiciones de alto nivel de  $O_2^-$  y por lo tanto, de acelerado metabolismo de NO, la quercetina puede proteger a dicho NO de diferentes maneras. En primer lugar, en los sistemas libres de células, cuando el  $O_2^-$  está incrementado enzimática o químicamente, la quercetina puede captar al  $O_2^-$  y proteger así al NO (López-López *et al.*, 2004) (figura 6). En segundo lugar, en el interior de las células, la quercetina puede no sólo captar al  $O_2^-$ , sino también inhibir su fuente enzimática, como por ejemplo, la XO y la NAD(P)H oxidasa (Busse *et al.*, 1984; Tauber *et al.*, 1984). Los metabolitos glucuronizados y sulfatados pueden prevenir, aunque menos efectivamente que la quercetina, el deterioro de la biodisponibilidad del NO en condiciones de alto estrés oxidativo (Lodi *et al.*, 2008). En tercer lugar, debido a sus propiedades antioxidantes, los flavonoides pueden evitar potencialmente la oxidación de la

tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y el desacoplamiento de la eNOS (Romero *et al.*, 2009), lo que conduciría a esta enzima hacia la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en lugar de NO. Finalmente, la quercetina puede inhibir las vías de señalización que conducen a la inducción de la p47<sup>phox</sup>, una subunidad citosólica de la NAD(P)H oxidasa que tras su fosforilación se trasloca a la membrana y aumenta la actividad de las subunidades catalíticas membranales (NOXs). Recientemente, se ha descrito a la NAD(P)H oxidasa vascular como una de las principales fuentes de ROS a nivel de las arterias de resistencia y conductancia (Redon *et al.*, 2003). Además tres de sus cinco NOXs se expresan en la vasculatura de roedores (NOX1, NOX2 [también conocida como gp91<sup>phox</sup>] y NOX4); siendo ésta última la que mayores niveles de expresión presenta (Lassegue *et al.*, 2001; Wingler *et al.*, 2001). Existen datos en ratones deficientes en NOX1 que sugieren un papel muy importante de dicha subunidad en la hipertensión inducida por angiotensina II (Ang-II) (Gavazzi *et al.*, 2006). En aorta de SHR se ha encontrado un incremento en la actividad NAD(P)H oxidasa vascular, así como en la expresión proteica de sus subunidades NOX1, NOX2 y NOX4, cuando son comparadas con los animales normotensos wistar kyoto (WKY) (Li *et al.*, 2006; Wind *et al.*, 2010).



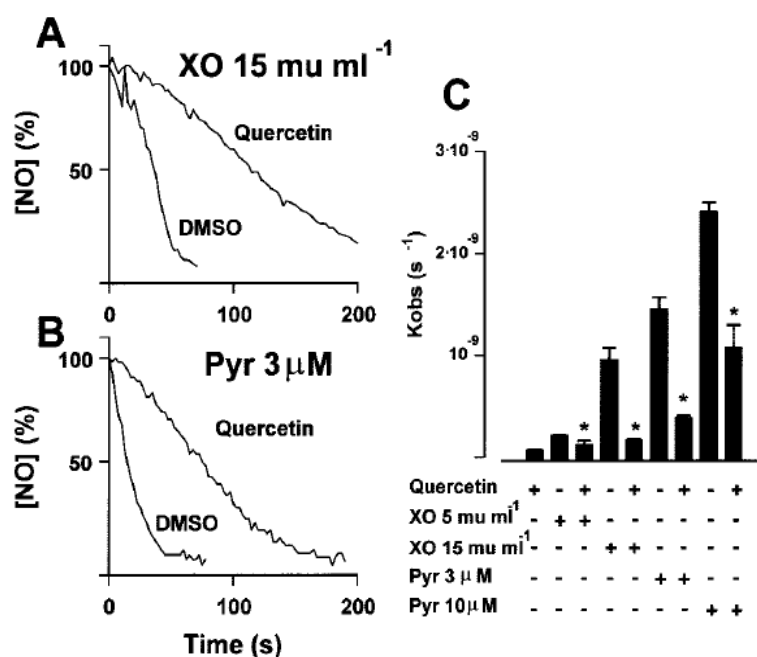


Figura 6. La quercetina (10  $\mu\text{M}$ ) protege al NO de la degradación inducida por el  $\text{O}_2$ . Éste es generado por (A) la enzima xantina oxidasa (XO, 15  $\text{mU/ml}$ ), más la hipoxantina (100  $\mu\text{M}$ ) o (B) el pirogalol (Pyr, 3  $\mu\text{M}$ ). El panel derecho muestra la constante de velocidad (Kobs) para la desaparición del NO en el tampón empleado, después de la corrección por la degradación espontánea del NO. \*,  $P < 0,05$  quercetina vs control. Gráfica tomada de López-López *et al.*, 2004.

Además de todo ello, la quercetina también puede prevenir el deterioro en la biodisponibilidad del NO inducido por la Ang-II (Sánchez *et al.*, 2007) y por la ET-1 (Romero *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2010b). Así, el efecto preventivo de la quercetina en la disfunción endotelial inducida por la ET-1 parece estar relacionado con la regulación a la baja de la subunidad p47<sup>phox</sup> a través de la inhibición de la PKC (Romero *et al.*, 2009). El metabolito Q3GA también previene dicha disfunción endotelial inducida por ET-1 (Romero *et al.*, 2009). Además, la quercetina *in vitro* también restaura el deterioro de la función endotelial en arterias de SHR (Ibarra *et al.*, 2003) y de ratas diabéticas (Ajay *et al.*, 2006).

*In vivo*, una alta dosis de quercetina añadida a la dieta llevó al aumento de la actividad NOS en la pared aórtica de ratas sanas, sin cambios en la expresión de la

eNOS, lo cual fue acompañado por un aumento en la relajación dependiente del endotelio (Benito *et al.*, 2002). En hombres sanos, la quercetina incrementa la concentración de S-nitrosotioles y nitritos en plasma y de nitratos en orina, lo que indirectamente apunta a un aumento del NO endotelial (Loke *et al.*, 2008). Sin embargo, la quercetina aún puede inducir efectos antihipertensivos *in vivo*, cuando la síntesis del NO está inhibida (en el modelo N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, *L-nitro-arginine methyl ester*) de hipertensión, como veremos en el apartado 4), lo que sugiere la participación conjunta de mecanismos independientes del NO.

El NO ejerce sus efectos vasodilatadores mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble en CMLV y el consiguiente aumento del guanosín monofosfato cíclico (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*). A su vez, el cGMP es metabolizado por las fosfodiesterasas (PDEs, *phosphodiesterases*) de nucleótidos cíclicos y, por lo tanto, la actividad NOS y la relajación dependiente del endotelio son altamente dependientes de la actividad de las PDEs. Así, los inhibidores de las PDEs pueden prevenir la disfunción endotelial en algunas circunstancias (Vlachopoulos *et al.*, 2004). Se ha observado que varios flavonoides son capaces de inhibir distintas isoformas de las PDEs (Picq *et al.*, 1989). Por tanto, la inhibición de estas PDEs puede representar otro mecanismo potencial de los flavonoides en la prevención de la disfunción endotelial. Además, la quercetina y su metabolito sulfatado mejoran selectivamente la relajación dependiente de cGMP mediante un mecanismo que no implica la inhibición de la PDE-5 (Suri *et al.*, 2010). Curiosamente, la quercetina y dicho metabolito también previenen la tolerancia a la nitroglicerina *in vitro* (Suri *et al.*, 2010), un efecto compartido con otros captadores de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Munzel *et al.*, 1999).

### **2.3. Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado del endotelio**

Además del NO, el EDHF es otro regulador importante en la función vascular, especialmente en arterias de resistencia. La naturaleza del EDHF, dependiendo del tipo de arteria considerada, se ha propuesto que puede ser el ácido epoxi-eicosatrienoico

(EET), el potasio ( $K^+$ ) o el  $H_2O_2$ , y la hiperpolarización de las células del músculo liso puede también ser transmitida desde las células endoteliales a través de las uniones mioendoteliales (Feletou y Vanhoutte, 2009). Recientemente, se ha observado que los efectos vasodilatadores de la quercetina son inhibidos por la charybdotoxina (ChTX), un bloqueante de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia intermedia ( $IK_{Ca}$ ) y larga ( $BK_{Ca}$ ) (Khoo *et al.*, 2010). Los autores concluyen que la quercetina libera EDHF, cuya actividad depende de la activación de canales de  $K^+$ . Nosotros creemos que esta conclusión no se apoya en los datos obtenidos. Los efectos demostrados por Khoo y colaboradores no pueden ser atribuidos al EDHF porque (1) la ChTX por sí sola no inhibe, o solo débilmente, la respuesta del EDHF, por lo que ésta debe emplearse en combinación con la apamina (bloqueante de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia lenta ( $SK_{Ca}$ )) (Corriu *et al.*, 1996) y (2) cuando las arterias son contraídas por altas concentraciones de KCl, como es este caso (70 mM), el potencial de membrana y el potencial en equilibrio se acercan tanto, que la apertura o el cierre de los canales de  $K^+$ , no afectan al flujo neto de este ión a través de la membrana ni al potencial de membrana (Quast y Cook, 1989). De hecho, altas concentraciones de KCl son a menudo empleadas para inhibir la respuesta del EDHF. Sin embargo, parte de las respuestas relajantes independientes del endotelio, inducidas por quercetina, pueden ser atribuidas a una activación de los canales  $BK_{Ca}$  directamente en células de músculo liso arteriales (Cogolludo *et al.*, 2007).

## **2.4. Efectos sobre endotelina-1**

La ET-1 es un potente vasoconstrictor liberado por las células endoteliales. La disfunción endotelial está asociada con una elevación de los niveles de ET-1 (Brunner *et al.*, 2006), y por otra parte, ella misma es capaz de inducir disfunción endotelial. La quercetina reduce la cantidad de ET-1 liberada por las células endoteliales de venas

umbilicales humanas (Zhao *et al.*, 1999) y por las células endoteliales aórticas bovinas (Khan *et al.*, 2002). *In vivo*, la quercetina también reduce la cantidad de ET-1 urinaria en ratones “knockout” para la proteína ApoE (Loke *et al.*, 2010) y en hombres sanos (Loke *et al.*, 2008).

## **2.5. Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales y células musculares lisas vasculares**

La apoptosis de células endoteliales evidentemente influye sobre la permeabilidad del endotelio vascular, lo que puede facilitar el desarrollo de diversas patologías. Los flavonoides han demostrado tener un doble efecto en la apoptosis de estas células, ya que pueden ejercer efectos antiapoptóticos o proapoptóticos, para mantener la adecuada integridad y funcionalidad del endotelio.

*In vitro*, estos flavonoides ejercen efectos que protegen de la apoptosis mediada por las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*) oxidadas y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células endoteliales de aorta bovina y fibroblastos (Vieira *et al.*, 1998), lo que parece estar relacionado con la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. También otro flavonoide del vino, la delphinidina, protege a las células endoteliales de la apoptosis (Martin *et al.*, 2003).

Por el contrario, se ha observado que algunos flavonoides promueven la apoptosis de células tumorales (Pan *et al.*, 2000), y pueden modular el nivel de expresión de proteínas protectoras (Bcl-2 [*B-cell lymphoma 2*], Bcl-xL [*B-cell lymphoma-extra large*] o Bcl2A1 [*Bcl-2-related protein A1*]) o factores proapoptóticos (Bax [*Bcl-2-associated X protein*], BID [*BH3 interacting domain death agonist*] o BAK [*Bcl-2 homologous antagonist/killer*]) (Nam *et al.*, 2001).

Hay pocos estudios sobre los efectos de los flavonoides en la proliferación endotelial, aunque en general se consideran inhibidores. Tanto la quercetina, el resveratrol como la delphinidina han mostrado ser inhibidores de todo este proceso (Igura

*et al.*, 2001; Favot *et al.*, 2003). Cabe también mencionar que la quercetina inhibe la proliferación endotelial y la migración y formación de los microtúbulos mitóticos (Igura *et al.*, 2001; Jackson y Venema, 2006; Ahn *et al.*, 2009). Este efecto está asociado con una disminución en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), pudiendo producir una reducción de la angiogénesis *in vivo* (Luo *et al.*, 2008). Esto podría desempeñar un papel clave en los efectos quimiopreventivos de la quercetina contra los tumores sólidos.

Muchos estudios han demostrado que la quercetina y su conjugado, Q3GA, inhiben la proliferación y la hipertrofia o inducen la apoptosis en CMLV en cultivo (Yoshizumi *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2003; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2006a). Los efectos inhibidores de la quercetina sobre la síntesis del DNA en CMLV, estimuladas por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ , *tumor necrosis factor-alfa*), parecen estar relacionados con la reducción de la actividad de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2, *extracellular-signal regulated kinase*), quinasa que juega un papel muy importante en la proliferación y diferenciación celular (Moon *et al.*, 2003). En CMLV estimuladas por Ang II y en CMLV con un fenotipo epitelioide (tipo celular con actividad secretora, no contráctil, que prolifera en la intima de la luz vascular durante el proceso aterogénico), la quercetina inhibe la hipertrofia mediante la disminución de la vía de la quinasa c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal (JNK, *Jun N-terminal Kinase*) (Yoshizumi *et al.*, 2002; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2006a). Estos efectos también pueden explicar el efecto antihipertensivo y antiaterogénico de la quercetina.

## **2.6. Efectos sobre la función endotelial en la hipertensión**

La elevación de la presión arterial es un factor importante y común en las principales enfermedades cardiovasculares, como son la enfermedad coronaria, el infarto cerebral, la enfermedad arterial periférica, la enfermedad renal y la insuficiencia cardíaca (Kannel *et al.*, 2000). Es bien conocido el efecto antihipertensivo de la dieta

rica en frutas y verduras en pacientes hipertensos (Appel *et al.*, 1997), y se ha atribuido principalmente a los antioxidantes presentes en estos alimentos, entre los que abunda, como hemos visto, la quercetina.

Los animales hipertensos, al igual que los pacientes con hipertensión esencial, desarrollan una reducción en la vasodilatación dependiente del NO. En diferentes modelos experimentales de hipertensión (SHR, acetato de deoxicorticosterona (DOCA)-sal y ratas Goldblatt) el tratamiento crónico con quercetina restauró el deterioro de la función vasodilatadora endotelial medida a través de la respuesta relajante a acetilcolina (ACh, *acetylcholine*) (Duarte *et al.*, 2001b; Galisteo *et al.*, 2004; García-Saura *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010a). Todos estos modelos se asociaron con un aumento plasmático, vascular y hepático del estado oxidativo, determinado por los niveles en plasma, tejido y orina de malonildialdehído (MDA) o isoprostanos, que fueron reducidos por la quercetina de forma constante (Duarte *et al.*, 2001b; Galisteo *et al.*, 2004; García-Saura *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2006). En conjunto, todos estos resultados sugieren un papel protector de la quercetina *in vivo* sobre la inactivación del NO inducida por el O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Además, en SHR, donde se detecta una regulación al alza de la expresión proteica de la eNOS, pero con una reducción paradójica de la actividad eNOS comparada con sus controles normotensos WKY, la quercetina normaliza ambos parámetros (Sánchez *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente para los experimentos *in vitro* con Ang II y ET-1, en SHR la quercetina puede prevenir la sobreexpresión de la p47<sup>phox</sup> (Sánchez *et al.*, 2006). Por otra parte, el tratamiento crónico con quercetina también reduce distintos marcadores de disfunción endotelial en ratones “knockout” para la apoproteína E (ApoE) (Loke *et al.*, 2010) y en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y sacarosa (Yamamoto y Oue, 2006).

Al contrario que ocurre con la vasodilatación dependiente del endotelio provocada por ACh, la relajación dependiente del endotelio inducida por insulina, que también está reducida en SHR, no se ve afectada tras el tratamiento crónico con

quercetina (Romero *et al.*, 2010a). El diferente perfil de actuación de la quercetina en la relajación inducida por estos dos agentes liberadores de NO endotelial, podría estar relacionado con las diferentes vías que emplean la ACh y la insulina en la activación de la eNOS. La ACh es un agonista colinérgico clásico que activa la eNOS por un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, la insulina tiene unas acciones vasodilatadoras independientes de  $Ca^{2+}$ , que están mediadas por un mecanismo dependiente de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3-K, *phosphoinositide-3-kinase*), con la participación de la proteína quinasa B (Akt), que a su vez, provoca la fosforilación de la eNOS (Montagnani *et al.*, 2001). La activación de la Akt y la fosforilación de la eNOS estimulada por la insulina, se encuentra reducida en anillos aórticos de ratas WKY y SHR tratadas crónicamente con quercetina (Romero *et al.*, 2010a). Este efecto puede estar relacionado con un efecto inhibitorio directo de la quercetina sobre la PI3-K (Yoshizumi *et al.*, 2002).

Además, los cambios en la vasodilatación dependiente del endotelio pueden ocurrir como consecuencia de la reducción en la liberación de prostanoides vasoconstrictores derivados del endotelio. La quercetina de forma crónica no modificó la vasoconstricción a ACh dependiente del endotelio en SHR (Duarte *et al.*, 2001b), pero lo inhibe marcadamente en ratas deficientes en NO (modelo L-NAME) (Duarte *et al.*, 2002) y en ratas hipertensas Goldblatt (2K1C-GB, *two-kidney, one-clip (2K1C) Goldblatt (GB)*) (García-Saura *et al.*, 2005).

La sirtuina 2 y su análogo en mamíferos, la sirtuina 1 (SIRT1, *Sirtuin1*) han sido implicadas en el aumento de la esperanza de vida inducida por la restricción calórica (Cohen *et al.*, 2004), y más recientemente en la prevención de la senescencia vascular (Ota *et al.*, 2010). La activación de las SIRT1 ha demostrado promover la vasodilatación dependiente del endotelio (Mattagajasingh *et al.*, 2007) y regular hacia la baja la expresión del receptor para la Ang II (Miyazaki *et al.*, 2008). El descubrimiento del papel de las sirtuinas en el estrés oxidativo y en la esperanza de vida ha abierto la

puerta a una nueva área de investigación en el campo de los polifenoles, ya que algunos polifenoles como la quercetina y el resveratrol pueden activar dichas sirtuinas (Howitz *et al.*, 2003). De hecho, la quercetina incrementa la esperanza de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Belinha *et al.*, 2007) y del gusano *Caenorhabditis elegans* (Pietsch *et al.*, 2009).

### **3. Flavonoides y plaquetas**

Los efectos como antiagregantes plaquetarios de los flavonoles fueron inicialmente descritos por Beretz y colaboradores (Beretz *et al.*, 1982). Inicialmente se sugirió que estos efectos se debían a sus acciones inhibitorias sobre las PDEs y por lo tanto, a un aumento del adenosín monofosfato cíclico (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*). Posteriormente, Gryglewski y colaboradores describieron las acciones de los flavonoides como captadores de  $O_2^-$  en las plaquetas, lo cual podría “resucitar la biosíntesis y la acción de las prostaciclina endoteliales y del EDHF”, y contribuir a sus efectos antitrombóticos (Gryglewski *et al.*, 1987). Más tarde, se descubrió que la quercetina inhibía la activación de la NAD(P)H oxidasa dependiente de PKC en las plaquetas (Pignatelli *et al.*, 2006). Y más recientemente, los efectos antiagregantes han sido asociados con el bloqueo de la actividad de la quinasa Fyn (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*) y de la fosforilación tanto de la tirosin-quinasa Syk (*spleen tyrosine kinase*) como de la fosfolipasa  $C\gamma 2$ , todas ellas componentes de la vía de señalización del colágeno a través del receptor para la glucoproteína VI plaquetaria (Hubbard *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2010).

El  $TXA_2$  es un potente inductor de la activación y agregación plaquetaria producida a través del metabolismo secuencial del ácido araquidónico por enzimas como la COX y la tromboxano sintasa. Una vez generado, dicho  $TXA_2$  actúa de manera paracrina y autocrina, incrementando la activación y el reclutamiento de las plaquetas



circulantes hacia la zona vascular dañada (Arita *et al.*, 1989). Estudios *in vitro* con la quercetina y otros flavonoides como apigenina, genisteina, luteolina y rutina, se han realizado en plaquetas estimuladas con el agonista de los receptores del TXA<sub>2</sub>, U46619, o con la trombina. Los efectos producidos sobre la liberación de Ca<sup>2+</sup> fueron analizados, viéndose disminuida la movilización de este ión de forma concentración dependiente por todos ellos, a excepción de la rutina. También produjeron una disminución en la fosforilación y activación de la proteína ERK 1/2, incrementada previamente por dichas estimulaciones (Guerrero *et al.*, 2007).

Los efectos antiagregantes *in vivo* de la quercetina han sido cuestionados durante muchos años, aunque en los últimos tiempos se han llevado a cabo varios estudios epidemiológicos en humanos que los ponen de manifiesto. En el primero de ellos, se administró una dieta rica en cebollas a voluntarios sanos, que proporcionaba 114 mg/día de quercetina, y en el que no se encontraron cambios en la agregación plaquetaria ni en la producción de TXB<sub>2</sub>, factor VII de la coagulación u otras variables hemostáticas (Janssen *et al.*, 1998). Sin embargo, posteriormente se han realizado otros dos estudios con resultados opuestos a éste. En el primero de ellos, se administraron 2 dosis diferentes de quercetina-4'-O-β-D-glucósido (150 mg ó 300 mg al día, en una única toma) en forma de suplemento, y se observó que la agregación plaquetaria era inhibida por ambas dosis. Esto se acompañó por una reducción en la fosforilación de la tirosin-quinasa Syk y de la fosfolipasa Cγ2, al igual que ocurría en los estudios *in vitro* realizados con el aglicón (Hubbard *et al.*, 2004). Por último, este mismo grupo de trabajo ha realizado un ensayo clínico a doble ciego, aleatorizado y cruzado, en la que los sujetos ingerían una sopa de cebolla enriquecida (69 mg) o no (5 mg) en quercetina. Al igual que en el caso anterior, la agregación plaquetaria estimulada por colágeno fue inhibida en los sujetos alimentados con la sopa enriquecida en quercetina, este efecto aparecía de forma tiempo-dependiente, y también se relacionó con la inhibición en la fosforilación de la tirosin-quinasa Syk (Hubbard *et al.*, 2006).

#### **4. Flavonoides e hipertensión**

La hipertensión es una de los factores de riesgo más importantes para los eventos cardiovasculares, incluyendo el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular. El tratamiento con cualquier régimen antihipertensivo comúnmente usado reduce el riesgo de los eventos cardiovasculares totales; una mayor reducción de la presión arterial, significa una mayor reducción del riesgo (Turnbull, 2003). Bajo condiciones rigurosamente controladas, el consumo de frutas y verduras está asociado a una reducción de la presión arterial (Dauchet *et al.*, 2009). Sin embargo, los efectos de frutas y verduras sobre la diabetes mellitus, el peso corporal y los niveles plasmáticos de lípidos no están claros todavía (Dauchet *et al.*, 2009).

El primer estudio sobre los efectos antihipertensivos de la quercetina se llevó a cabo en ratas SHR, las cuales manifiestan un modelo genético de hipertensión multifactorial (Duarte *et al.*, 1993b) (figura 7). Este estudio fue confirmado y ampliado por otros (Machha y Mustafa, 2005; Sánchez *et al.*, 2006; Carlstrom *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2010a) y seguido por otros informes en otros modelos experimentales clásicos de rata hipertensa, como son la hipertensión inducida por la inhibición crónica de la síntesis de NO con L-NAME (Duarte *et al.*, 2002), ratas hipertensas por nefrectomía unilateral y administración de DOCA más una dieta rica en sal (modelo DOCA-sal) (Galisteo *et al.*, 2004), ratas hipertensas 2K1C-GB (García-Saura *et al.*, 2005), ratas Dahl sensibles a la sal (dieta hipernatrémica) (Aoi *et al.*, 2004; Mackraj *et al.*, 2008) y en ratas hipertensas con constricción aórtica (Jalili *et al.*, 2006).

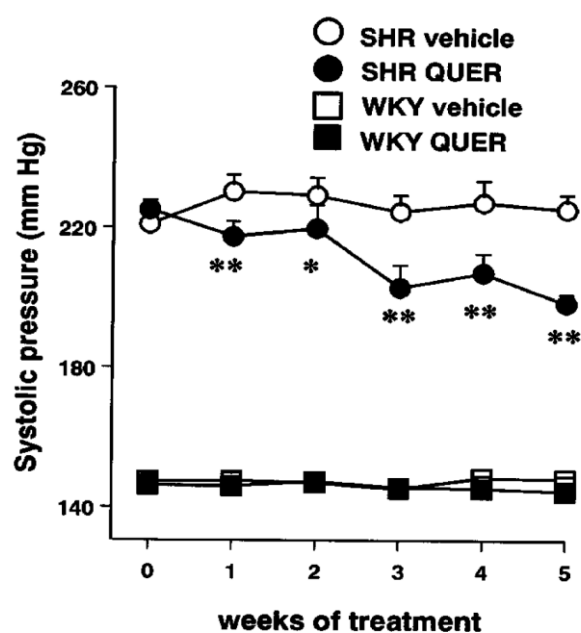


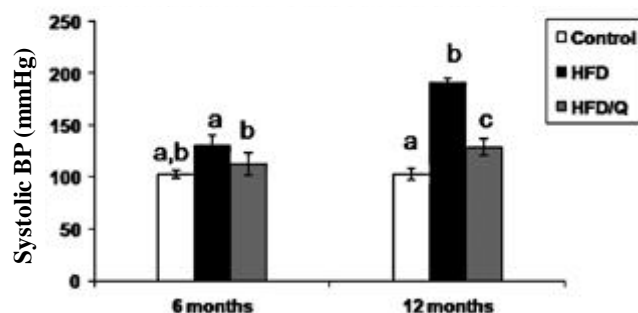
Figura 7. Efectos antihipertensivos de la quercetina (QUER) en ratas normotensas (WKY) y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Evolución temporal de la presión arterial sistólica media, determinada por pletismografía en la cola en los grupos WKY control (vehicle, n=7), WKY quercetina (n=7), SHR control (n=10) y SHR quercetina (n=10). Los valores están expresados como media  $\pm$  error estándar medio. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs grupo SHR control. Gráfica tomada de Duarte et al., 2001b.

Además, la quercetina también redujo la presión arterial en modelos animales con resistencia a la insulina y síndrome metabólico tales como las ratas Zucker obesas (Rivera *et al.*, 2008b) y en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y sacarosa (Yamamoto y Oue, 2006). Por lo tanto, la quercetina ha demostrado efectos antihipertensivos cuando se administra crónicamente en los modelos de roedores más comunes para la hipertensión. La dosis de uso más frecuente es de 10 mg/kg de peso/día, pero las dosis efectivas empleadas van desde 2 a 30 mg/kg de peso y día. El efecto antihipertensivo es dosis dependiente y afecta a los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media. Este efecto suele comenzar durante la primera semana de tratamiento y se mantiene durante todo el periodo de tratamiento. Curiosamente, la reducción de la presión arterial es de larga duración, permaneciendo por lo menos

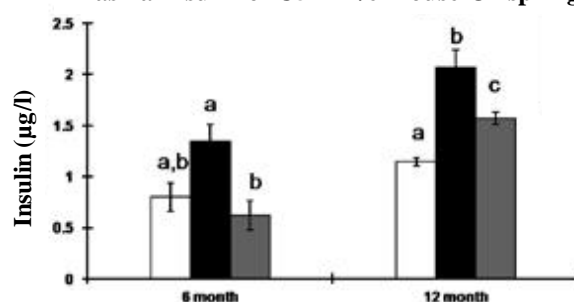
después de 48 horas de la interrupción del tratamiento. Sorprendentemente, la quercetina fue eficaz en todos los modelos de hipertensión analizados, independientemente del origen de la misma, del estado en que se encuentre el sistema renina-angiotensina, del estrés oxidativo, del NO y otros factores. Además, es importante recalcar que la quercetina no ejerce efectos hipotensores, es decir, no tiene ningún efecto en los animales normotensos WKY (figura 7).

De acuerdo con la llamada “hipótesis de Barker”, fuertemente apoyada por los estudios epidemiológicos en humanos y animales, muchas enfermedades crónicas en adultos, incluyendo la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad y la hipertensión, pueden tener su origen en la vida del feto debido a los cambios en la programación genética (Barker, 1998). Así, los descendientes adultos de las ratas o ratones, alimentados con una dieta alta en grasas durante el embarazo, mostraron hiperglucemia adulta, resistencia a la insulina, obesidad e hipertensión, a pesar de ser alimentados con una dieta estándar durante toda la vida postnatal (Buckley *et al.*, 2005). Recientemente, un estudio muy interesante (Liang *et al.*, 2009) mostró que estos efectos se redujeron en los ratones alimentados con una dieta suplementada con quercetina durante el embarazo (figura 8). Estos resultados sugieren que la quercetina puede evitar la programación epigenética durante la vida prenatal.

**A** Systolic Blood Pressure of C57BL/6 Mouse Offspring



**B** Plasma Insulin of C57BL/6 Mouse Offspring



**Figura 8.** Valores de presión arterial sistólica (A) y niveles de insulina en plasma (B) en la descendencia (6 y 12 meses de edad) de los ratones alimentados con una dieta control (control), una dieta rica en grasas (HFD, high fat diet), o una dieta rica en grasas suplementada con quercetina (HFD/Q) durante el embarazo. Barras con letras distintas representan diferencias significativas entre los valores,  $P < 0,05$ . Gráfica tomada de Liang *et al.*, 2009.

Una presión arterial elevada mantenida en el tiempo es uno de los determinantes más poderosos en el desarrollo de las enfermedades cardíacas, vasculares y renales. La mayoría de los beneficios del tratamiento antihipertensivo, en el daño sobre los órganos diana, son el resultado de la bajada de la presión arterial *per se* y son, en gran medida, independientes de la droga o clases de medicamentos empleados (Turnbull, 2003). La quercetina ha demostrado una reducción de la hipertrofia ventricular izquierda en SHR (Duarte *et al.*, 1993b), en ratas hipertensas DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004), en ratas hipertensas 2K1C-GB (García-Saura *et al.*, 2005), en ratas Dahl sensibles a la sal (Aoi *et al.*, 2004; Mackraj *et al.*, 2008) y en ratas hipertensas con constricción aórtica (Jalili *et al.*, 2006). Los flavonoles también producen efectos protectores sobre la estructura y

la función renal en los modelos animales de hipertensión como son las ratas deficientes en NO (Duarte *et al.*, 2002), las ratas hipertensas DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004), las ratas hipertensas 2K1C-GB (García-Saura *et al.*, 2005) y las ratas Dahl sensibles a la sal (Aoi *et al.*, 2004; Mackraj *et al.*, 2008). El efecto protector sobre la función endotelial en estos modelos animales se han mencionado anteriormente, en el apartado 2.6.

Recientemente se han publicado tres ensayos clínicos cruzados y aleatorizados, realizados a doble ciego y controlados con placebo, que analizan los efectos de la quercetina en la presión arterial. En el estudio de Edwards y colaboradores, los pacientes (hombres y mujeres) con hipertensión en estado 1 tuvieron una reducción en la presión arterial sistólica, diastólica y media después del tratamiento con quercetina (730 mg/día separados en dos dosis), pero dicho flavonol no tuvo efectos significativos sobre los pacientes pre-hipertensos (Edwards *et al.*, 2007). Sin embargo, en el estudio de Egert y colaboradores, donde los pacientes (hombres y mujeres) con síndrome metabólico fueron clasificados de acuerdo con sus genotipos ApoE, la quercetina (150 mg/día divididos en tres tomas) redujo la presión arterial sistólica en el grupo ApoE3 homocigótico, mientras que no fueron observados efectos significativos en los pacientes con el genotipo ApoE4. Además, la quercetina no tuvo efectos sobre el perfil lipídico en los portadores de ApoE3, pero ejerció un efecto deletéreo en el grupo ApoE4, produciendo una reducción de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *high-density lipoprotein*) séricas y un incremento de la ratio LDL/HDL (Egert *et al.*, 2010). El último de estos ensayos (Pfeuffer *et al.*, 2011), ha sido realizado en hombres pre-hipertensos, clasificados también según su genotipo ApoE y siguiendo la misma pauta de dosificación que en el estudio de Egert y colaboradores. En él, se ha analizado la función endotelial, no obteniendo cambios significativos tras el tratamiento de 8 semanas con quercetina. Respecto a la presión arterial, cabe mencionar la reducción producida sobre la presión arterial sistólica postprandial, pero aquí sin distinción entre los genotipos de ApoE. En otro estudio, llevado a cabo en voluntarios sanos (Conquer *et al.*, 1998) el consumo de quercetina no modificó significativamente algunos de los

factores de riesgo cardiovascular, incluyendo la presión arterial. No obstante, esta falta de efecto en los pacientes sanos, no es sorprendente dada la falta de efecto de la quercetina en animales sanos, como se ha descrito anteriormente (figura 7).

## **5. Flavonoides y aterosclerosis**

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial caracterizada por el engrosamiento de la pared arterial, causado por el depósito de materiales grasos durante muchos años. Los síntomas se manifiestan de forma aguda en las últimas etapas de la enfermedad (Badimon *et al.*, 1993). La alteración en el perfil lipídico sérico es un evento temprano y crucial en el desarrollo de la aterosclerosis. El estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial se asocian con la patogénesis de la aterosclerosis. Concretamente unos niveles plasmáticos elevados de LDL están estrechamente relacionados con el desarrollo acelerado de la enfermedad (Lusis, 2000).

El consumo de bajas dosis de quercetina reduce la progresión de la aterosclerosis en ratones deficientes en ApoE (Hayek *et al.*, 1997; Loke *et al.*, 2010). Curiosamente la quercetina fue más efectiva que otros flavonoides representativos [epicatequina (3-flavanol), teaflavina (dímero de catequina)] y otros polifenoles [sesamina (lignano), ácido clorogénico (ácido fenólico)] (Loke *et al.*, 2010). Los flavonoles pueden proteger contra la aterosclerosis mediante la prevención de uno o varios de los procesos implicados en la progresión de la enfermedad tales como el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial. La mayoría de los estudios han demostrado que la quercetina no tiene ningún efecto beneficioso en el perfil lipídico plasmático. Así, ninguno de los principales tipos de colesterol plasmático (LDL y HDL) están modificados en ratones “knockout” ApoE (Hayek *et al.*, 1997), en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y sacarosa (Yamamoto y Oue, 2006) o en seres humanos con sobrepeso con genotipo ApoE3 e incluso puede aparecer reducida la ratio LDL/HDL en

portadores del genotipo ApoE4 (Egert *et al.*, 2010). Por el contrario, se ha demostrado que la quercetina reduce los niveles de triglicéridos y colesterol séricos en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol (Kamada *et al.*, 2005), y en un ensayo clínico realizado en hombres sanos, donde redujo la concentración plasmática de triglicéridos postprandiales e incrementó la del colesterol HDL (Pfeuffer *et al.*, 2011).

Además de los efectos sobre los lípidos plasmáticos, la quercetina inhibe los pasos cruciales en el desarrollo de la aterosclerosis como la susceptibilidad de las LDL a su oxidación (Frankel *et al.*, 1993; Hayek *et al.*, 1997), la citotoxicidad inducida por dichas LDL oxidadas (Negre-Salvayre y Salvayre, 1992) y la formación de estrías grasas aórticas (Auger *et al.*, 2005). Existe un estudio reciente en el que se ha comprobado la relación entre la estructura química de más de 20 sustancias derivadas del 4-oxo-flavonoide y el efecto inhibitorio sobre la disfunción endotelial, provocada por la oxidación de las LDL, en células endoteliales vasculares. En él se ha demostrado que la mayoría de los flavonoides probados como morina, miricetina, fisetina y quercetina a concentraciones de 40  $\mu\text{M}$  o mayores, producen efectos significativos sobre la viabilidad celular y los niveles de moléculas solubles de adhesión intercelular tipo 1 (sICAM-1, *soluble intercellular adhesion molecule 1*), de MDA y de NO (Yi *et al.*, 2011). Curiosamente, los metabolitos de quercetina se acumulan en las lesiones ateroscleróticas humanas, pero no en las aortas normales (Kawai *et al.*, 2008). La quercetina también redujo significativamente el contenido aórtico de isoprostanos, el  $\text{O}_2^-$  vascular, los leucotrienos  $\text{B}_4$  vasculares, y las concentraciones plasmáticas de selectina P, y aumentó el NO y la hemo-oxigenasa 1 en ratones ApoE  $-/-$  (Loke *et al.*, 2010). Las moléculas de adhesión y las metaloproteinasas de la matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*) son proteínas clave para varios procesos implicados en la formación de la placa aterosclerótica como la infiltración de las células inflamadas. La quercetina es capaz de reducir el aumento que provoca el  $\text{TNF}\alpha$  en la expresión proteica de diferentes moléculas de adhesión como la molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*), la molécula de adhesión intercelular 1



(ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*) en CMLV y células endoteliales humanas. Sin embargo, los tres principales metabolitos de quercetina, Q3GA, Q3'S e I3GA, no tuvieron casi efecto (Tribolo *et al.*, 2008; Winterbone *et al.*, 2009). El efecto inhibitorio en la expresión de las ICAM-1 ocurre a través de una regulación a la baja de la vía JNK/AP-1 (*activator protein 1*) (Kobuchi *et al.*, 1999). Además, la quercetina también puede preservar la actividad de las paraoxonasas séricas humanas (PON1, *serum paraoxonase/arylesterase-1*) (Aviram *et al.*, 1999) e incrementar su expresión (Gong *et al.*, 2009), un mecanismo adicional que permite proteger a las LDL de su oxidación y desempeñar un papel protector en la aterosclerosis. Sin embargo, los efectos de los flavonoides aislados en el desarrollo de la aterosclerosis en humanos no han sido abordados.

Los mecanismos moleculares por los cuales la quercetina puede antagonizar la expresión de genes inflamatorios no han sido totalmente clarificados. La quercetina y otros flavonoides inhiben la producción del TNF $\alpha$ , así como la expresión de la NOS inducible (iNOS, *inducible nitric oxide synthases*) y la producción de NO en macrófagos activados por lipopolisacárido (LPS), mediante la inhibición de la vía del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B, *nuclear transcription factor-kappa B*), a través de la reducción de la fosforilación del I $\kappa$ B- $\alpha$  (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) (Gong *et al.*, 2009). También se han demostrado estos mismos efectos (reducción en la producción de NO e inhibición en la expresión de la iNOS) para la quercetina y dos de sus principales metabolitos plasmáticos humanos, Q3GA y Q3'S, en arteria coronaria aislada de cerdo activada por LPS, los cuales posiblemente también se deban a un mecanismo de inhibición de la vía del factor nuclear NF $\kappa$ B (Al-Shalmani *et al.*, 2011). En contraposición, la miricetina, actúa antagonizando los efectos antiinflamatorios producidos por la quercetina (Al-Shalmani *et al.*, 2011). Recientemente se ha descrito que las propiedades

antiinflamatorias de la quercetina y la isorramnetina, en macrófagos RAW264.7, también se acompañan de un incremento en la expresión proteica de hemo-oxigenasa 1, a través de la activación del factor de transcripción nuclear Nrf2 (también conocido como NFE2L2, *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*). (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2011). Además, el microRNA-155, que posee carácter proinflamatorio, es regulado a la baja por quercetina e isorramnetina, pero no por Q3GA (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2011).

## **6. Flavonoides, obesidad y resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina, definida como una respuesta atenuada o inadecuada a una determinada cantidad de insulina, se asocia con una amplia variedad de patologías incluyendo la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión esencial, la enfermedad cardiovascular, el síndrome del ovario poliquístico, el hígado graso no alcohólico, el cáncer de mama y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Las relaciones recíprocas entre la disfunción endotelial, la resistencia a la insulina, la obesidad y la hipertensión pueden ayudar al acoplamiento de las anomalías hemodinámicas y metabólicas observadas en todos estos problemas de salud pública interrelacionados entre sí (Kim *et al.*, 2006).

### **6.1. Obesidad**

La obesidad surge debido a un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, que conduce al crecimiento patológico de los adipocitos. Esto es inducido por la hipertrofia de los adipocitos y la generación de nuevos adipocitos a partir de células precursoras. La exposición de los preadipocitos 3T3-L1 a la quercetina produce una adipogénesis atenuada y también una expresión disminuida de las enzimas y los factores relacionados con dicha adipogénesis. El tratamiento de los adipocitos 3T3-L1

con la quercetina también dio lugar a la inducción de la apoptosis y a una disminución concomitante de la fosforilación de la ERK 1/2 y del JNK (Ahn *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008).

Nuevas opciones en la prevención y el tratamiento de la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 podrían basarse en estrategias para frenar o inhibir la absorción de las grasas, la absorción del colesterol y el catabolismo intestinal de los carbohidratos complejos. Nuevas pruebas indican que el transportador intestinal de glucosa (GLUT2, *intestinal glucose transporter 2*) existente en el revestimiento apical o luminal, es una vía muy importante en la absorción de azúcares simples, y por lo tanto un objetivo atractivo para tales posibles agentes (Kellet y Brot-Laroche, 2005). Una inhibición no competitiva del transportador GLUT2, para el transporte de glucosa y fructosa, expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* fue producida por los flavonoides quercetina, mirecitina, fisetina y su precursor glucosídico isoquercitrina. Los otros dos grandes transportadores intestinales de azúcares, GLUT5 y SGLT1 (*intestinal sodium/glucose cotransporter*), no fueron afectados por dichos flavonoides (Kwon *et al.*, 2007). El transporte de azúcares por el transportador GLUT2, cuando éste se sobre-expresa en células de la hipófisis o cuando está presente de forma natural en células Caco-2E intestinales, fue igualmente inhibido por la quercetina (Kwon *et al.*, 2007). Dos beneficios clave se podrían obtener de ello: 1) la reducción de la hiperglucemia postprandial en sujetos diabéticos y en sujetos con intolerancia leve a la glucosa y 2) la reducción de la cantidad total de glucosa absorbida como estrategia de reducción de las calorías y, por tanto, de peso. Debido a que la quercetina puede actuar como un potente inhibidor de la absorción luminal de azúcares, los flavonoides podrían ser una promesa como nuevos agentes farmacológicos en el tratamiento de la obesidad.

Sin embargo, cuando la quercetina fue testada en roedores y seres humanos obesos, su impacto en el peso corporal no quedó claro. En ratas Zucker obesas, una administración oral diaria durante 10 semanas de 2 ó 10 mg/kg de quercetina redujo la

ganancia de peso corporal, pero sólo con la dosis mayor (Rivera *et al.*, 2008b). Del mismo modo, una reducción de la ganancia de peso corporal fue observada sólo para la dosis mayor de quercetina (0,2% y 0,5% de la dieta) en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y sacarosa (Yamamoto y Oue, 2006). En un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratones, la suplementación dietética con una dosis alta de quercetina (0,8% de la dieta) produjo un aumento transitorio del gasto energético, que no se detecta posteriormente tras 8 semanas con dicha dieta (Stewart *et al.*, 2008). Así mismo, sujetos con sobrepeso u obesos, y síndrome metabólico, tratados con 150 mg/día de quercetina durante dos periodos de 6 semanas, no tuvieron cambios significativos en los parámetros del estatus nutricional incluyendo el peso corporal, la circunferencia de la cintura, la masa grasa y la masa libre de grasa (Egert *et al.*, 2010). En contraposición, en el ensayo clínico realizado por Pfeuffer y colaboradores, empleando la misma dosificación de quercetina durante dos periodos de 8 semanas, han encontrado que este flavonol redujo significativamente la circunferencia de la cintura, sin modificar parámetros como el índice de masa corporal o el propio peso corporal del sujeto (Pfeuffer *et al.*, 2011).

## 6.2. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina surge a partir de una compleja interacción entre la sobrecarga de nutrientes, el exceso de ácidos grasos sistémicos, el retículo endoplásmico y el estrés oxidativo (Hotamisligil, 2006) y la hipoxia en el tejido adiposo (Regazzetti *et al.*, 2009). La acción de la insulina se inicia con su unión al receptor de la insulina, continua con su auto-fosforilación y la fosforilación de sustratos para el receptor de la insulina (IRS, *insulin receptor substrate*) y es seguida por una compleja cascada de quinasas y mediadores (Sesti, 2006). Estos incluyen la subunidad reguladora p85 de la PI3-K, el fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PI3P, *phosphatidylinositol 3-phosphate*), la proteína quinasa dependiente de fosfoinositoles (PDK, *phosphoinositide-dependent protein kinase*) y la cascada de Akt, así como las isoformas  $\zeta$  y  $\lambda$  atípicas de

la PKC (Stump *et al.*, 2006). Tanto ambas PKC  $\zeta/\lambda$  atípicas como la Akt son importantes mediadores en el transporte de glucosa en el músculo, permitiendo la traslocación del transportador GLUT4 al sarcolema para facilitar la entrada de la glucosa al interior de las células (Ishiki y Klip, 2005). La acumulación de metabolitos lipídicos como consecuencia de la alteración del metabolismo de los ácidos grasos puede tener un profundo impacto en la vía de señalización de la insulina. La acumulación de intermediarios lipídicos como el triacilglicerol, el diacilglicerol, y la ceramida es conocido que activan quinasas como la vía JNK/AP-1, la vía de la quinasa inhibidora de  $\kappa B$  (IKK, *inhibitory  $\kappa B$  kinase*)/NF $\kappa B$  y la PKC, que inhiben la acción de la insulina, lo cual actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa (Yu *et al.*, 2002). Los actuales enfoques farmacológicos para tratar la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 incluyen las glitazonas (agonistas de receptores activados por el proliferador de peroxisomas gamma [PPAR $\gamma$ , *peroxisome proliferator-activated receptors*]), la metformina (activador de una proteína quinasa dependiente de AMP [AMPK, *5' AMP-activated protein kinase*]), las sulfonilureas (bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> dependientes de adenosín trifosfato [ATP, *adenosine triphosphate*]), la acarbosa (inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa), los análogos de la amilina, miméticos de la incretina y los inhibidores de la dipeptidil-peptidasa 4 (Rodbard *et al.*, 2007).

Como ha sido mencionado anteriormente, un posible mecanismo por el que la quercetina puede ser beneficiosa en la resistencia a la insulina y en la diabetes mellitus tipo 2 es por la inhibición de los transportadores de glucosa intestinales. Además, la quercetina también inhibe la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (Li *et al.*, 2009), previniendo la digestión intestinal de los carbohidratos de forma más potente que la acarbosa, lo cual puede también ayudar a reducir la hiperglucemia postprandial.

La quercetina y demás flavonoides relacionados han sido descritos como inhibidores (Strobel *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2008) o como activadores (Fang *et al.*, 2008) de la insulina inducida por la captación de glucosa en los adipocitos. Estas

acciones opuestas pueden ser explicadas porque los flavonoides, inhibidores de un amplio espectro de proteínas quinasas, han sido descritos como inhibidores de la actividad de las quinasas involucradas en la vía de señalización de la insulina, como también de las involucradas en el desarrollo de la resistencia a la insulina en varios tejidos (Dias *et al.*, 2005; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2006a; Granado-Serrano *et al.*, 2010). Además, el efecto inhibitorio de la quercetina y la miricetina sobre la insulina, estimulada por la captación de metilglucosa por los adipocitos, se ha relacionado con un mecanismo de inhibición de dicho transporte a través de una interacción directa entre los flavonoides y el transportador GLUT4, en lugar de por un mecanismo relacionado con el contenido de proteínas quinasas y la inhibición de la señalización de la insulina (Strobel *et al.*, 2005). Por otro lado, el aumento en la captación de glucosa también puede estar relacionado con una interacción con los receptores PPAR $\gamma$ . El kaenferol y la quercetina actuaron como agonistas parciales y débiles de los PPAR $\gamma$  en un ensayo genético, pero no pudieron inducir la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 como los agonistas PPAR $\gamma$  tradicionales (Fang *et al.*, 2008). Cuando eran añadidos junto con la rosiglitazona, agonista PPAR $\gamma$ , sí que podían inhibir la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1. Un análisis competitivo de unión al ligando confirmó que el kaenferol y la quercetina podrían competir con la rosiglitazona por el mismo punto de unión como al PPAR $\gamma$  (Fang *et al.*, 2008).

La AMPK, un miembro de la familia de proteínas quinasas sensibles a metabolitos, también regula el transporte de glucosa en el músculo esquelético (Bergeron *et al.*, 1999; Fryer *et al.*, 2002). Dado que el músculo esquelético es el responsable de la eliminación de un 80% de la carga oral de glucosa y que la diabetes mellitus tipo 2 está asociada con una reducción en la eliminación de glucosa por el músculo esquelético, la AMPK puede ser crucial en el control de toda la homeostasis de la glucosa corporal y quizás de la capacidad de ejercicio. La exposición a quercetina regula al alza los niveles de fosforilación de la AMPK y su sustrato, la acetil-CoA

carboxilasa. La quercetina y otros flavonoides pueden activar la AMPK en células de carcinoma hepático (HepG2) a través de la activación de análogos de la SIRT1 (Suchankova *et al.*, 2009). Incluso, en células de músculo esquelético C2C12, la quercetina aumenta la absorción de glucosa en ausencia de insulina, lo cual se relacionó con la activación de AMPK (Eid *et al.*, 2010).

Los estudios *in vivo* con flavonoides sobre la resistencia a la insulina también han producido resultados contradictorios. En ratas Zucker obesas, una administración oral diaria durante 10 semanas de 2 ó 10 mg/kg de quercetina, reduce la dislipemia, la resistencia a la insulina y la hipertensión (Rivera *et al.*, 2008b). La liberación de adipocitoquinas (leptina, resistina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y adiponectina) así como de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , interleukinas (IL) 1 y 6 y MCP-1), fuertemente involucradas en la resistencia a la insulina y en la inflamación crónica, fueron también medidas. La quercetina redujo la producción de TNF $\alpha$  y la expresión de la NOS intestinal proinflamatoria en el tejido adiposo visceral, e incrementó la concentración plasmática de adiponectina (Rivera *et al.*, 2008b). Además, en un modelo de obesidad inducida por la dieta, la quercetina administrada conjuntamente (0,8% de la dieta) también disminuyó marcadores circulatorios de inflamación (interferón- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  e IL-4), aunque no mejoró la resistencia a la insulina inducida por dicha dieta (Stewart *et al.*, 2008). De forma semejante, en SHR, que además de presentar una hipertensión genética también muestran resistencia a la insulina (Reaven y Chang, 1991), encontramos que la prueba de tolerancia oral a la glucosa, la evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina y los valores de colesterol total y triglicéridos no se vieron afectados por la quercetina (Romero *et al.*, 2010a).

La generación de estrés oxidativo afecta a la secreción pancreática de insulina por las células  $\beta$  (Bast *et al.*, 2002). Los flavonoides pueden preservar la función de las células  $\beta$ -pancreáticas por reducción del estrés oxidativo inducido por el daño tisular y,

por tanto, proteger contra la progresión de la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 2. De hecho, la quercetina previene y protege contra el estrés oxidativo y el daño en las células  $\beta$ , inducidos por la administración de estreptozotocina en el páncreas de rata (Coskun *et al.*, 2005) y disminuye la concentración de glucosa en sangre en ambos modelos de ratas diabéticas inducidas por alloxan y estreptozotocina (Nuraliev y Avezov, 1992; Coskun *et al.*, 2005; Kobori *et al.*, 2009), dos modelos de diabetes mellitus tipo 1.

Un estudio reciente (Liang *et al.*, 2010) demostró que la diabetes mellitus gestacional inducida por estrés oxidativo en la placenta en ratones era mitigada significativamente por una suplementación con quercetina. Los resultados de este informe también revelaron que la quercetina disminuía parcialmente la hiperglucemia y la hiperinsulinemia materna, y ofreció información adicional sobre la gestión preventiva y terapéutica de la diabetes mellitus gestacional, una enfermedad comúnmente encontrada a mediados o finales del embarazo.

A pesar del papel tan crucial de la resistencia a la insulina en el desarrollo de la aterosclerosis y el riesgo cardiovascular, no hay estudios en humanos que aborden el papel de la suplementación crónica con flavonoides como un enfoque terapéutico para el tratamiento de la resistencia a la insulina. Hay dos estudios epidemiológicos que analizan la relación entre la ingesta de flavonoides y la diabetes mellitus tipo 2, que a su vez han producido resultados contradictorios. Una tendencia hacia la reducción en el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 fue asociada con una mayor ingesta de quercetina y miricetina en este primer estudio (Knekt *et al.*, 2002), mientras que en un gran estudio en mujeres estadounidenses libres de enfermedades cardiovasculares, una alta ingesta de flavonoles y flavonas no tuvo una asociación significativa con el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina (Song *et al.*, 2005).



## 7. Flavonoides e isquemia cardíaca

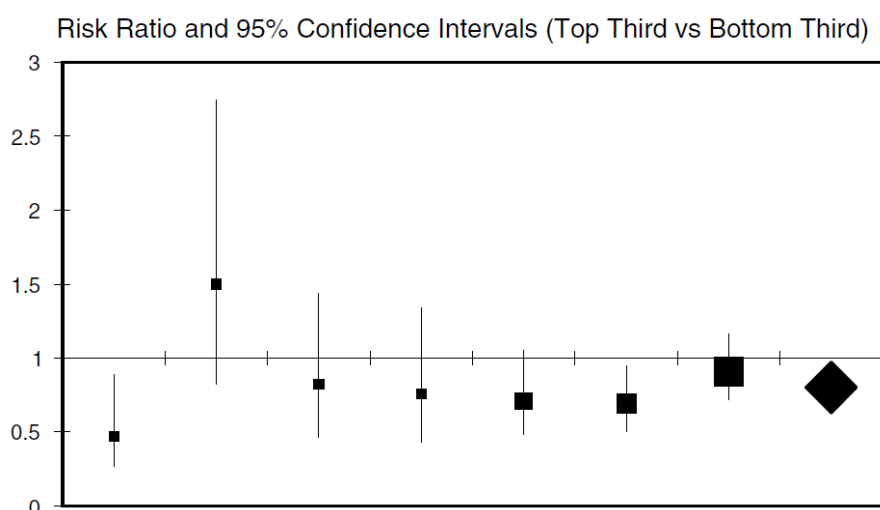
Las enfermedades coronarias crónicas y los síndromes coronarios agudos implican múltiples alteraciones en la reactividad vascular, la estructura vascular y las interacciones entre la pared de los vasos y los elementos de la circulación sanguínea.

La hipertensión y la aterosclerosis son los principales factores de riesgo para el infarto de miocardio y existen muchísimas evidencias que indican que la reducción del colesterol LDL, de las lesiones ateroscleróticas y de la presión arterial produce una dramática disminución del riesgo de las enfermedades coronarias (Turnbull, 2003). Adicionalmente, la disfunción endotelial es un factor de mal pronóstico independiente para el infarto de miocardio (Schachinger *et al.*, 2000; Widlansky *et al.*, 2003). Los flavonoides al prevenir la hipertensión, la aterosclerosis y la disfunción endotelial, como se ha mencionado anteriormente, pueden proteger a las arterias coronarias a largo plazo.

La mayor parte de los eventos coronarios ocurren como consecuencia de la ruptura de una placa aterosclerótica, de la formación de un trombo y de la posterior isquemia cardíaca. La degradación del colágeno intersticial, el cual confiere resistencia biomecánica a la placa fibrosa, por parte de las MMPs parece estar involucrada en la inestabilidad y ruptura de dicha placa. La quercetina reduce la expresión de varias de las MMPs (MMP-2 y MMP-9) (Huang *et al.*, 1999) y ello puede ayudar en la estabilización de la placa de ateroma (Motoyama *et al.*, 2009). Los vasoespasmos coronarios pueden también contribuir a la alteración aguda del flujo arterial. Los flavonoides por sus efectos como antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores, como ya se ha mencionado en los apartados 3 y 4, pueden también proporcionar beneficios adicionales protectores en la fase aguda. Durante el evento isquémico y la reperfusión eventual post-isquemia hay un proceso inflamatorio agudo con liberación de múltiples citoquinas y ROS. La reperfusión post-isquemia que ocurre en las enfermedades coronarias se asocia generalmente a una reducción en la producción endógena de NO, resultante de la

disfunción endotelial y el daño tisular debido a la infiltración de neutrófilos. Estudios experimentales en modelos animales en los que la isquemia se induce agudamente, mediante la ligadura de la arteria coronaria o la infusión de isoprenalina, han demostrado que la quercetina reduce la disfunción contráctil del corazón, el tamaño del infarto y el patrón de cambios en la expresión proteica (incluyendo iNOS y COX2) inducidas por la isquemia cardíaca (Brookes *et al.*, 2002; Annapurna *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2009; Punithavathi y Prince, 2010). Estos efectos pueden ser observados después de la ingesta de quercetina *in vivo* y *ex vivo*. La mayoría de los estudios asocian el efecto protector en el corazón con los efectos antioxidantes de la quercetina. La capacidad de los flavonoides para proteger el NO probablemente juega un papel crucial en la prevención de la isquemia.

En un influyente informe epidemiológico (Hertog *et al.*, 1993), la ingesta de flavonoides (analizado en terciles) estaba inversamente asociada con la mortalidad por enfermedad coronaria [riesgo relativo 0,42 (intervalo de confianza (IC) 95%: 0,20-0,88)] después de ajustar por factores conocidos y otros componentes de la dieta. También se observó una relación inversa, levemente significativa, con la incidencia de infarto de miocardio. Un número similar de estudios epidemiológicos lo siguieron, y el meta-análisis de estos estudios de cohortes prospectivos concluyó que los individuos en el tercio superior de consumo de flavonoides en la dieta están asociados con una reducción del riesgo [0,80 (IC 95%: 0,69-0,93)] de mortalidad por enfermedades coronarias comparados con los del tercio inferior (figura 9) (Huxley y Neil, 2003).



*Figura 9. Estudios prospectivos de cohortes sobre los flavonoides y la enfermedad coronaria. Ratios de riesgo con los tercios superior e inferior de las mediciones de referencia. ■ indican la razón de riesgo en cada estudio, con un tamaño proporcional del cuadrado al número de eventos de enfermedad coronaria fatal, y las líneas horizontales representan el 95% de la IC. La razón del riesgo combinado y su IC del 95% se denota por el diamante negro. Figura tomada de Huxley y Neil, 2003.*

## 8. Flavonoides y accidente cerebrovascular

La primera causa de accidente cerebrovascular es la interrupción del flujo sanguíneo cerebral ocurrido durante la obstrucción vascular por trombo-embolismo o por trombosis local. Los procesos patofisiológicos en el accidente cerebrovascular son complejos y dependen de la gravedad, duración y localización del daño isquémico en el cerebro. Los principales factores de riesgo que conducen a la aparición de accidentes cerebrovasculares son la hipertensión, la aterosclerosis, el colesterol LDL, la diabetes mellitus y la fibrilación atrial. Los flavonoides se han propuesto como eficaces agentes preventivos y como opciones de tratamiento en la fase aguda del ictus (Simonyi *et al.*, 2005). Como se ha descrito anteriormente, los flavonoides previenen la disfunción endotelial, la aterosclerosis, la hipertensión, y posiblemente la trombosis; todos

mecanismos potenciales para prevenir los accidentes cerebrovasculares. Con respecto al tratamiento agudo, los flavonoides podrán actuar en diferentes fases del ictus cerebral. Para la fase aguda, los flavonoides mejoran el flujo sanguíneo cerebral, previenen la agregación plaquetaria y la trombosis, reducen la excitotoxicidad e inhiben el estrés oxidativo. Para la fase intermedia, los flavonoides reducen la inflamación y protegen la integridad endotelial. Y para la fase final, los flavonoides interfieren con la isquemia inducida por los mecanismos de muerte celular como la apoptosis y la necrosis (Silva *et al.*, 2008).

La quercetina y el kaenferol, en condiciones *in vitro*, inhiben la excitotoxicidad. De hecho, ambos agentes reducen significativamente la muerte neuronal causada por el kainato y N-metil-D-aspartato (Silva *et al.*, 2008). La neuroprotección observada fue correlacionada con la prevención en la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y con el mantenimiento del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial. Estos flavonoides reducen la peroxidación lipídica mitocondrial y la pérdida del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial causada por el estrés oxidativo inducido por el adenosín difosfato (ADP, *adenosine diphosphate*) y el hierro. Así, la acción neuroprotectora inducida por la quercetina y el kaenferol era atribuida principalmente a sus efectos antioxidantes (Silva *et al.*, 2008). Además, la quercetina anuló la hipoxia inducida por el incremento en los receptores tipo 1 y 2 para el IP3 en células granulares del cerebelo de rata, y reguló el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Jurkovicova *et al.*, 2007). La quercetina también protegió eficazmente las neuronas granulares del cerebelo o las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, de la muerte inducida por el estrés oxidativo (Mercer *et al.*, 2005; Echeverry *et al.*, 2010).

*In vivo*, la quercetina también ha sido descrita como posible captadora de  $\text{O}_2^-$  liberados durante la reperfusión, después de una isquemia cerebral producida mediante un modelo de oclusión de cuatro buques en ratas (Shutenko *et al.*, 1999). En otro estudio, la reducción global de la isquemia inducida por el daño neuronal fue atribuida a la inhibición de la actividad MMP-9 (Cho *et al.*, 2006). Sin embargo, en un modelo de

daño oxidativo neuronal *in vivo*, mediante la infusión unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA, *6-hydroxydopamine*) en el haz medial del cerebro anterior (Zbarsky *et al.*, 2005), la quercetina o la fisetina no tuvieron ningún efecto sobre la pérdida de la tirosina hidroxilasa en células positivas de la sustancia negra. La falta de capacidad de la quercetina en algunos modelos *in vivo*, a pesar del efecto *in vitro* neuroprotector sobre el daño inducido por diferentes estímulos, se debe probablemente a las dificultades que ésta posee para cruzar la barrera hematoencefálica y penetrar así en el cerebro. Además, los metabolitos de la quercetina parecen ser menos neuroprotectores e incluso penetran en el cerebro de forma menos eficiente que los aglicones, a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el aumento de la permeabilidad en la barrera hematoencefálica puede ocurrir bajo condiciones inflamatorias, como ocurre en los accidentes cerebrovasculares, lo cual facilitaría la penetración en el cerebro de dicha quercetina. Cuando los flavonoides son administrados en una preparación de lecitina para facilitar que atraviesen la barrera hematoencefálica, el tratamiento de la isquemia focal disminuyó el tamaño de la lesión (Dajas *et al.*, 2003). El efecto protector frente a la lesión isquémica fue demostrado por un incremento significativo en el número de células en el cuerpo estriado y en la corteza, junto con una reversión parcial del déficit motor. Por otra parte, la reducción de los niveles de glutatión disminuyó después de la isquemia, en el cuerpo estriado y en la corteza, y la preparación de quercetina liposomal revirtió estos efectos 24 horas después de la oclusión parcial permanente de la arteria cerebral (Rivera *et al.*, 2008a).

La administración crónica de la quercetina tiene propiedades antiinflamatorias en el cerebro. De hecho, en los ratones tratados con LPS, la quercetina inhibe la expresión de enzimas proinflamatorias como COX2 e iNOS, revirtiendo el déficit de memoria inducido por dicho LPS (Patil *et al.*, 2003). En células de la microglía BV-2 estimuladas por LPS/interferón- $\gamma$ , la quercetina produce un efecto inhibitorio en la expresión de la iNOS y en la producción de NO (Kao *et al.*, 2010). Esta acción

antiinflamatoria de la quercetina puede ser atribuida a sus efectos inhibitorios y a sus efectos antioxidantes. Estos diferentes mecanismos están en sinergia con la disminución en la expresión de la iNOS y en la producción del NO que describen Kao y colaboradores (Kao *et al.*, 2010). Además, el grupo de investigación de Sharma demostraron que los flavonoides confieren una protección frente a la IL-1 $\beta$  inducida por el daño neural en los astrocitos, mediante: (i) la mejora del potencial de activación de los astrocitos para detoxificar los radicales libres (SOD 1 y mediadores de la tiorredoxina), (ii) la reducción en la expresión de las citoquinas proinflamatorias (IL-6) y quimiocinas (IL-8, IP-10 [*interferon-gamma-inducible protein 10*], MCP-1 y RANTES [*regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*]), y (iii) la modulación de la expresión de mediadores asociados con el incremento de la actividad fisiológica de los astrocitos en respuesta a una lesión (Sharma *et al.*, 2007).

Hay muchos estudios epidemiológicos prospectivos sobre la relación entre la ingesta de flavonoides y los accidentes cerebrovasculares. El estudio Zutphen describe una relación inversa entre los accidentes cerebrovasculares y un consumo elevado de flavonoides en la dieta (principalmente quercetina) tras ser ajustados por varios factores de confusión, incluyendo la ingesta de vitaminas (Keli *et al.*, 1996). Posteriormente, dos estudios de cohortes (Yochum *et al.*, 1999; Knekt *et al.*, 2000) llevados a cabo en Finlandia y EE.UU., respectivamente, demostraron que el riesgo relativo de enfermedad cerebrovascular fue similar entre los sujetos con un consumo alto o bajo de flavonoides. Así, los autores concluyeron que la ingesta de quercetina no está asociada con las enfermedades cerebrovasculares. Sin embargo, muy recientemente, un meta-análisis de 6 estudios prospectivos de cohortes (Hollman *et al.*, 2010) encontró que un alto consumo de flavonoides en comparación con un bajo consumo se asoció inversamente con la posibilidad de sufrir un accidente cerebrovascular no fatal y fatal, respectivamente, con un riesgo relativo de 0,80 (IC 95%: 0,65-0,98). Se concluyó, por tanto, que los flavonoides pueden reducir el riesgo de accidente cerebrovascular, incluso cuando el sesgo de publicación se sospecha.

## 9. Biodisponibilidad y metabolismo de los flavonoides

Los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (figura 10) que se dan en el organismo han sido ampliamente estudiados para algunos de los flavonoides (Scalbert y Williamson, 2000; Manach *et al.*, 2004; Williamson y Manach, 2005), pero debido a sus diversos efectos y propiedades, es difícil extrapolar resultados o asumir un mismo mecanismo o proceso para todos, por eso nos centraremos en la quercetina, principal flavonol presente en la dieta y objeto de esta Tesis Doctoral, del que se sabe bastante sobre su farmacocinética, y que ha sido recientemente revisada por el grupo de Terao (Terao *et al.*, 2011).

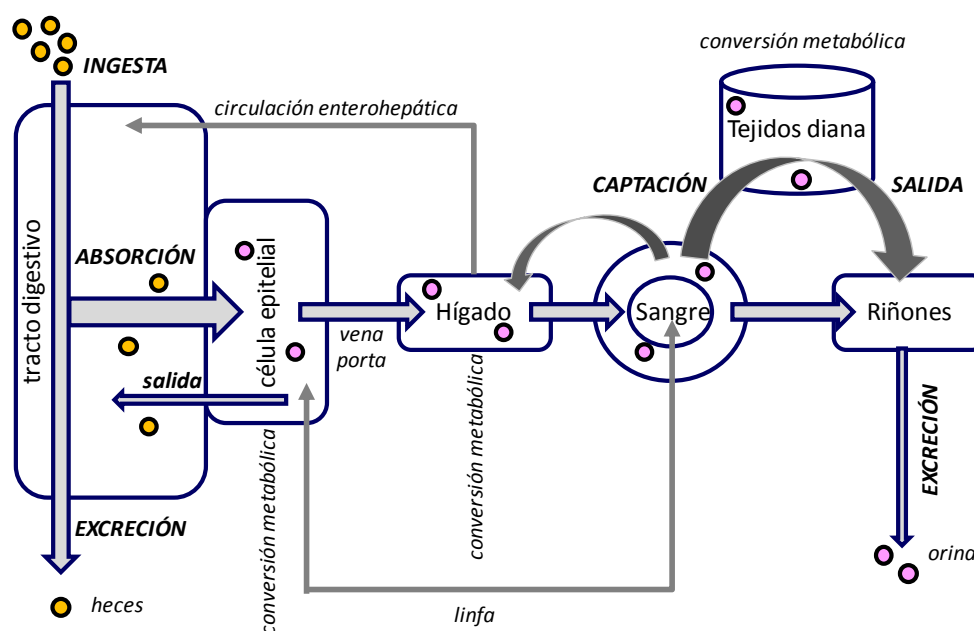


Figura 10. Absorción, distribución, metabolismo y excreción de la quercetina procedente de la dieta tras la ingestión oral. ● Quercetina aglicón y sus glucósidos; ● Metabolitos de quercetina. Imagen adaptada de Terao *et al.*, 2011.

## 9.1 Absorción

En los alimentos, todos los flavonoides, excepto los flavanoles, se encuentran como glicósidos (unidos a diferentes azúcares), lo que influye en su absorción (aunque no en la proporción de sus metabolitos circulantes). Aunque en estudios anteriores no se había observado, Hollman y colaboradores demostraron que la quercetina era absorbida por los humanos (Hollman *et al.*, 1995). Recientes estudios en animales y en humanos han demostrado que tras ser ingeridos, la quercetina y otros flavonoides relacionados se absorben mayoritariamente en el intestino delgado (10-50%), fundamentalmente como agliconas o glucósidos (Hollman y Katan, 1999; Day *et al.*, 2003). El pico máximo de absorción se da a las 0,5-0,7 horas tras la ingestión de quercetina 4'-glucósido (Graefe *et al.*, 2001). Estos glucósidos de quercetina procedentes de la dieta pueden ser hidrolizados a su aglicona por la acción de la saliva (Boots *et al.*, 2008), aunque el sitio principal donde se produce dicha hidrólisis es en las células epiteliales del intestino delgado (Terao *et al.*, 2011). Aún así, los glucósidos de quercetina van a ser absorbidos en el intestino delgado, incluso de forma más eficaz que la aglicona sola (52% de los glucósidos *vs* 24% de la aglicona) (Hollman *et al.*, 1995), debido a la existencia de un transportador de glucosa sodio-dependiente en la membrana de los enterocitos (SGLT1) (Gee *et al.*, 1998; Gee *et al.*, 2000). Una vez penetran a través de dicha membrana, estos glucósidos pueden seguir varios caminos: (1) ser hidrolizados por las  $\beta$ -glucosidasas específicas intracelulares, ó (2) ser expulsados por los transportadores apicales relacionados con la resistencia a múltiples fármacos (MRP, *multi-drug resistance protein*) [MRP2 y MRP3] (Walle y Walle, 2003), y tras ello, ser hidrolizados por las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ Gluc) específicas y/o por la lactasa florizina hidrolasa (LPH, *lactase phlorizin hydrolase*) presentes en la superficie celular (Day *et al.*, 2000) (figura 11). No obstante, la función del transportador SGLT1 en el transporte de quercetina (como aglicona o glicosilada) y otros flavonoides ha sido cuestionada recientemente (Kottra y Daniel, 2007). Durante muchos años se discutió la presencia en plasma de



glicósidos de quercetina, pero actualmente está aceptado que estos compuestos no se encuentran en el plasma a dosis nutricionales, y que prácticamente tampoco están presentes como aglicona, sino en sus formas conjugadas (Graefe *et al.*, 2001; Sesink *et al.*, 2001).

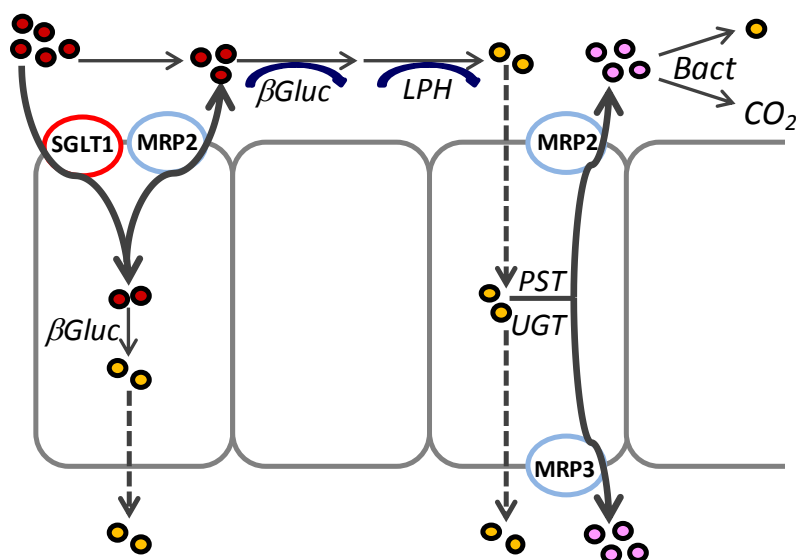


Figura 11. Vías de transporte y metabolización de la quercetina procedente de la dieta, en el lumen y en el interior de los enterocitos del tracto digestivo. ● Quercetina aglicón y sus glicósidos procedentes de la dieta; ● Quercetina aglicón; ● Metabolitos glucuronizados y/o sulfatados de quercetina. El transportador de glucosa sodio-dependiente (SGLT1) y las proteínas apicales 2 y 3 asociadas con la resistencia a múltiples fármacos (MRP2/3) son transportadores de membrana. Bact, bacterias de la microbiota intestinal; βGluc, β-glucosidasa; LPH, lactasa-floricina hidrolasa; PST, enzima sulfotransferasa fenol; UGT, enzima uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferasa. Imagen adaptada de Walle, 2004.

## 9.2. Metabolismo

El primer paso del metabolismo de flavonoides tanto en ratas como en humanos ocurre en el intestino delgado, donde muchos de los flavonoides absorbidos sufren metilación, sulfatación (por acción de la enzima sulfotransferasa fenol [PST, *phenol sulfotransferase*]) y/o conjugación con el ácido glucurónico (a través de la enzima

uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferasa [UGT, *uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase*] (Terao *et al.*, 2011) (figura 11), principalmente en posición 3' (Spencer *et al.*, 1999; Williamson y Manach, 2005). El 20-40% de la quercetina absorbida es metilada en la posición 3', formándose la isorramnetina (Day *et al.*, 2001). La catecol-O-metil transferasa (COMT) es la enzima que cataliza la transferencia de este grupo metilo desde la s-adenosil-l-metionina a los polifenoles con una parte catecólica, y aunque está presente en numerosos tejidos, es sobre todo activa en el hígado y los riñones. Por tanto, tras la ingestión de alimentos ricos en quercetina, como las cebollas, se encontraron en el plasma humano diferentes metabolitos de quercetina como son la Q3GA, la 3'-O-metilquercetina-3-O-glucurónido (también denominado como I3GA) y la Q3'S, mayoritariamente (Day *et al.*, 2001). Las PSTs catalizan la transferencia de un grupo sulfato desde la 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato a un grupo hidroxilo de diversos sustratos, como los flavonoides, lo que ocurre en el hígado (Piskula y Terao, 1998). Las UGTs, enzimas unidas a membrana que se encuentran en el retículo endoplásmico de liposomas de numerosos tejidos, son las encargadas de catalizar la transferencia de un grupo glucurónico desde el ácido UDP-glucurónico a la mayoría de los constituyentes de la dieta, como los flavonoides. Además de las transformaciones que se dan durante estos procesos, las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal también puede producir ácidos fenólicos y aromáticos a partir de los flavonoides. Así, la degradación de quercetina produce principalmente ácido 3,4-dihidroxifenil acético, ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil acético y ácido 3-hidroxifenil acético (Day *et al.*, 2001; Aura *et al.*, 2002).

Todas estas transformaciones hacen que estos metabolitos presenten propiedades fisicoquímicas (tamaño, polaridad y forma iónica) y actividades biológicas (propiedades antioxidantes, efecto vasodilatador y actividad enzimática) diferentes a las de quercetina, siendo responsables de muchos de los efectos biológicos de ésta.

### 9.3. Distribución

La incubación *in vitro* de quercetina con plasma sanguíneo humano mostró que ésta se une ampliamente a proteínas plasmáticas (un 99% a concentraciones por encima de 15  $\mu\text{M/L}$ ). También sus metabolitos se unen intensamente a proteínas plasmáticas en el plasma de ratas alimentadas con una dieta enriquecida en quercetina (Manach *et al.*, 1995), principalmente a albúmina. El efecto de la conjugación es desconocido, pero probablemente dependerá de la posición en la que se realice la sustitución, y ya se demostró (Dangles *et al.*, 1999) que la parte catecol de la quercetina unida a la albúmina permanecía accesible a agentes oxidantes, lo que sugiere que quercetina podría ejercer sus efectos incluso unida a proteínas plasmáticas.

La partición de los polifenoles y sus metabolitos entre las fases acuosas y lipídicas es ampliamente favorable hacia la acuosa, por su hidrofilia y su unión a la albúmina. Pero en algunos modelos de membranas lipofílicas, algunos polifenoles penetraron dichas membranas en diferentes grados. La quercetina mostró la interacción más profunda, probablemente debido a su capacidad para adquirir una conformación plana (Van Acker *et al.*, 1996).

Las concentraciones plasmáticas obtenidas con quercetina son muy variadas dependiendo de los estudios. Las concentraciones medias para quercetina tras una noche de ayuno fueron de unos 50-80 nM/L, y los valores disminuyeron con una dieta pobre en polifenoles en voluntarios sanos (Erlund *et al.*, 2002). En otros estudios, la concentración en plasma alcanzó 1,5  $\mu\text{M/L}$  tras 28 días de suplementación con una alta dosis de quercetina (más de 1 g/día) (Conquer *et al.*, 1998), y 0,63  $\mu\text{M/L}$  tras la suplementación con 80 mg/día de quercetina durante 1 semana (Moon *et al.*, 2000). En el trabajo comparativo de 97 estudios de biodisponibilidad de polifenoles en humanos (Manach *et al.*, 2005), se determinó que la concentración máxima media en plasma para los glucósidos de quercetina era de  $1,46 \pm 0,45 \mu\text{M/L}$ . Hay que señalar que hay una gran

variación interindividual, posiblemente debido a polimorfismos de las enzimas intestinales o de los transportadores de membrana.

Actualmente, sin embargo, la determinación de la biodisponibilidad de los polifenoles y sus metabolitos en los tejidos parece ser mucho más importante que el conocimiento de sus concentraciones plasmáticas, pero los datos son muy escasos, incluso en animales. Erlund y colaboradores realizaron un estudio en humanos con dos dosis de quercetina oral (8 y 50 mg), y empleando una metodología analítica de HPLC más específica molecularmente, consiguieron demostrar niveles plasmáticos de los metabolitos conjugados con glucurónido y/o sulfatados de quercetina (Erlund *et al.*, 2000), que en otros estudios eran indetectables. Curiosamente, las concentraciones de conjugados de quercetina en plasma tras la administración de quercetina como aglicona o de rutina, fueron similares en magnitud, pero diferentes respecto a su aparición en el tiempo. Este retraso en la aparición del pico de concentración tras la administración de rutina se explica porque debe ser hidrolizada a quercetina en el intestino delgado (Erlund *et al.*, 2000).

Gracias al empleo de polifenoles marcados radiactivamente, se ha determinado que de 1 a 6 horas después de la administración de una única dosis en ratas o ratones, estos compuestos se encuentran distribuidos en sangre y tejidos del sistema digestivo, como estómago, intestino e hígado (Ueno *et al.*, 1983; Mullen *et al.*, 2002). Pero también se han detectado en muchos más tejidos, como cerebro, células endoteliales, corazón, riñones, páncreas, huesos, pulmones, testículos y tejido adiposo blanco (Youdim *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Bieger *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2008). Las concentraciones en estos tejidos fueron de 30 a 3000 ng de aglicona/ g de tejido, dependiendo de la dosis administrada y el tejido considerado. Es importante señalar respecto a este tema que algunos tejidos son capaces de incorporar polifenoles mediante mecanismos específicos. Así, el endotelio parece ser uno de los principales lugares de acción de los flavonoides, ya que incluso hay un rápido sistema de transporte

activo en las células endoteliales aórticas para la entrada en ellas de flavonoides como la morina (Schramm *et al.*, 1999). La naturaleza de los metabolitos en los tejidos podría ser distinta de los encontrados en sangre, debido a la entrada o la eliminación específica tisular de algunos metabolitos o a un metabolismo intracelular. Aunque hay pocos estudios al respecto (Maubach *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2002), éstos indican que las concentraciones plasmáticas de flavonoides no están directamente relacionadas con las concentraciones de ellos en los tejidos diana, y que la distribución entre sangre y tejidos también varía dependiendo de los polifenoles tratados. Un estudio realizado con [<sup>14</sup>C]quercetina aglicón administrada en humanos de forma oral e iv, ha proporcionado gran información adicional sobre el destino biológico de este flavonoide (Walle *et al.*, 2001). Comparando ambas vías de administración, se podría concluir que la absorción a través de la vía oral fue mayor (36-54%) en los seis sujetos estudios. Sin embargo, en ambos casos la biodisponibilidad era cercana a cero. Curiosamente, la vida media plasmática de la radioactividad total fue muy elevada (20-72 horas), lo que puede deberse en parte a la recirculación enterohepática (figura 11), y puede incluir metabolitos de quercetina con actividad biológica.

Una característica de la biodisponibilidad de quercetina, que la diferencia de la mayoría de los flavonoides, es que la eliminación de sus metabolitos es muy lenta, con unas vidas medias de entre 11-28 horas (Graefe *et al.*, 2001), lo que facilita su acumulación en plasma y tejidos tras dosis repetidas o un consumo frecuente de productos vegetales, que alarga la duración de sus efectos.

#### **9.4. Excreción**

Los polifenoles pueden ser excretados por la vía urinaria o por la vía biliar, si los metabolitos son más grandes o están extensamente conjugados, dependiendo del polifenol en cuestión. La excreción biliar de estos compuestos en humanos no se ha examinado, por lo que todos los datos hacen referencia a animales de laboratorio. Las

bacterias intestinales, gracias a sus  $\beta$ -glucuronidasas, pueden liberar las agliconas de los metabolitos conjugados secretados con la bilis, y estas agliconas pueden ser reabsorbidas, entrando en el ciclo enterohepático, lo que parece demostrado en ratas para la genisteína (Coldham y Sauer, 2000) y en humanos para hesperedina y las isoflavonas de la soja (Manach *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 1998). Cabe destacar, que en el estudio realizado con [ $^{14}\text{C}$ ]quercetina (Walle *et al.*, 2001), la principal vía de excreción fue el dióxido de carbono (23-81% de la dosis), determinado a través del aire espirado. Esto enfatiza la importancia de las bacterias en la parte inferior del intestino, como última etapa de eliminación de éste, y probablemente, de otros muchos flavonoides (figura 11).

Además, para quercetina y sus glicósidos la excreción urinaria es del 0,3-1,4% de la dosis ingerida (Graefe *et al.*, 2001), ó  $2,5 \pm 1,2\%$  según el resultado global de los 97 estudios sobre biodisponibilidad de flavonoides (Manach *et al.*, 2005). Estos bajos valores no están muy alejados entre sí, e indican una importante excreción biliar, lo que concuerda con su intenso metabolismo.



## *Justificación y objetivos*

---





Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en el mundo occidental y su prevalencia continúa creciendo (Murray y López, 1997). Así por ejemplo, la cardiopatía isquémica junto con los accidentes cerebrovasculares, son responsables de casi un tercio de las muertes en Europa. El tratamiento farmacológico, aunque parcialmente efectivo, es claramente insuficiente, lo que hace necesario una estrategia preventiva dirigida a reducir de manera precoz los factores de riesgo. Existen una serie de factores de riesgo cardiovascular no modificables, como son la historia familiar, el sexo, la raza o la edad. Sin embargo, los factores de riesgo modificables como los niveles de colesterol, la hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes y los hábitos alimentarios inadecuados, representan una contribución importantísima a la morbi-mortalidad cardiovascular (Greenland *et al.*, 2003).

A partir del trabajo pionero de Hertog (Hertog *et al.*, 1993), diversos estudios epidemiológicos han descrito una asociación inversa entre la ingesta de flavonoides (flavonoles y flavonas) de la dieta y la mortalidad por cardiopatía isquémica (Knekt *et al.*, 1996; Rimm *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1997; Ness y Powles, 1997; Arai *et al.*, 2000; Hirvonen *et al.*, 2001). La presencia de flavonoides en un gran número de alimentos de origen vegetal podría explicar en parte el efecto beneficioso de las dietas ricas en frutas y verduras. Por otro lado, se ha sugerido que los flavonoides, entre otros polifenoles presentes en el vino, podrían ser responsables de la *paradoja francesa*, es decir, de la tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica menor de lo esperable que se observa en Francia (St Leger *et al.*, 1979; Renaud *et al.*, 1992; Truelsen *et al.*, 1998). De las numerosas acciones que presentan los flavonoides (Formica y Regelson, 1995) se ha propuesto que son sus efectos antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1996), vasodilatadores (Duarte *et al.*, 1993a; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002) y antiagregantes (Gryglewski *et al.*, 1987) los que podrían explicar su acción beneficiosa en la patología cardiovascular. Existen también evidencias indirectas de que diversos flavonoides pueden proteger contra el daño en macromoléculas celulares (lípidos, proteínas, DNA), lo que apoya su

posible papel en la prevención de enfermedades en las que el estrés oxidativo es un componente importante de la enfermedad (Meydani, 2001). Los flavonoides, y en particular la quercetina, presentan una actividad inhibitoria sobre una gran diversidad de enzimas (Formica y Regelson, 1995; Middleton *et al.*, 2000). Como consecuencia de ello, inhiben múltiples vías de señalización que resultan en cambios de la actividad celular de manera inmediata y/o en cambios en la proliferación celular y en la expresión génica.

La ingesta media diaria, en la dieta occidental, de flavonoles se estima en alrededor de los 23 mg, contribuyendo la quercetina en un 60-75 % del total (Hertog *et al.*, 1993; Sampson *et al.*, 2002). El promedio en la ingesta de flavan-3-oles se encuentra dentro de un rango similar, con unas cantidades que oscilan entre los 28-31 mg, siendo la (+)-catequina (en adelante, catequina) y la epicatequina las más abundantes (Manach *et al.*, 2004). Los perfiles de los efectos biológicos muestran marcadas diferencias entre las diversas clases de flavonoides (Loke *et al.*, 2010). Por ejemplo, los flavonoles ejercen una vasodilatación sistémica y coronaria (Duarte *et al.*, 1993b; Ibarra *et al.*, 2002), mientras que la catequina ejerce un efecto vasodilatador débil (Duarte *et al.*, 1993b). Ambos grupos de flavonoides muestran efectos antioxidantes *in vitro* y pueden prevenir la disfunción endotelial *in vivo* (Duarte *et al.*, 2001b; Ihm *et al.*, 2009). Debido a su distribución tan ubicua, los diferentes tipos de flavonoides están presentes juntos en los mismos alimentos y/o se consumen en la misma comida. De hecho, el prototipo de comida rica en flavonoides contiene una gran variedad de flavonoides en cantidades diversas. Sin embargo, poco se sabe sobre las posibles interacciones entre ellos respecto a sus mecanismos de acción. Recientemente se ha descrito que la quercetina y la catequina actúan de forma sinérgica para inhibir la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de NO en plaquetas (Pignatelli *et al.*, 2000; Pignatelli *et al.*, 2006), efectos que podrían también tener lugar a nivel vascular. Además, también han sido descritas interacciones farmacocinéticas, observándose que su administración conjunta modifica

su absorción, pero no su metabolismo (Silberberg *et al.*, 2005). Por todo ello, **el primer objetivo de esta Tesis Doctoral fue “determinar si existe una interacción entre la quercetina y la catequina con influencia en la prevención de la disfunción endotelial *in vitro* y los posibles mecanismos implicados”.**

Una vez que la quercetina es absorbida en el tracto gastrointestinal, se metaboliza rápidamente mediante metilación y conjugación con ácido glucurónico y/o ión sulfato en los enterocitos y, adicionalmente, en el hígado (Manach *et al.*, 1998; Scalbert y Williamson, 2000). Estos metabolitos conjugados presentan una vida media plasmática larga (~24 h) y se acumulan en plasma tras la administración diaria repetida (Hollman *et al.*, 1996). Los principales metabolitos conjugados de quercetina en plasma humano son (Williamson *et al.*, 1996; Plumb *et al.*, 1997; Manach *et al.*, 1998; Plumb *et al.*, 1999; Erlund *et al.*, 2000; Scalbert y Williamson, 2000; Graefe *et al.*, 2001; DuPont *et al.*, 2002; Nemeth *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2001) la quercetina-3-glucurónido (Q3GA), la quercetina-3'-sulfato (Q3'S), la isorramnetina-3-glucurónido (I3GA) y una quercetina-diglicurónido no caracterizada completamente, acompañadas por cantidades menores de los 4'-glucurónidos de quercetina e isorramnetina. La metilación para formar la isorramnetina (3'-metiléter de quercetina) es un importante proceso en el metabolismo de quercetina. La isorramnetina podría ser importante para explicar algunos de los efectos asociados a la ingestión de quercetina, ya que ésta presenta una vida media más prolongada y una mayor potencia vasodilatadora en arterias de resistencia (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002). Sin embargo, las formas libres de quercetina e isorramnetina apenas son detectadas en plasma, lo que se conoce como la *paradoja de los flavonoides*, la cual cuestiona los datos científicos generados a lo largo de décadas empleando los compuestos no conjugados *in vitro* y plantea la duda de cuál o cuáles son los compuestos responsables de la actividad biológica, y hace suponer que los metabolitos conjugados deben jugar un papel determinante en estos posibles efectos beneficiosos.

La naturaleza y el número de sustituyentes de los grupos hidroxilo fenólicos tiene profundos efectos tanto sobre las propiedades scavenger de radicales libres como sobre la actividad enzimática y vasodilatadora de la quercetina (Duarte *et al.*, 1993b; Williamson *et al.*, 1996; Plumb *et al.*, 1997; Plumb *et al.*, 1999), por lo que el tipo de metabolitos conjugados circulantes es determinante para explicar la actividad biológica. Sin embargo, los datos disponibles sobre la actividad de los metabolitos de quercetina son escasos. Estudios recientes han demostrado que los principales metabolitos de la quercetina en el plasma humano (Q3GA, Q3'S e I3GA), en general, muestran unos efectos más débiles *in vitro* que su genina libre (Lodi *et al.*, 2008; Lodi *et al.*, 2009; Winterbone *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010). Se ha descrito que la Q3GA inhibe la actividad de la JNK y previene la hipertrofia vascular (Yoshizumi *et al.*, 2002). También hemos observado que al contrario que la quercetina y la isorramnetina, los metabolitos de la quercetina carecen de efecto vasodilatador directo. Además, estos metabolitos tampoco sufren procesos de auto-oxidación, no generan radicales libres y no inhiben la actividad biológica de NO. Sin embargo, son capaces de inhibir la actividad de la NAD(P)H oxidasa y captar radicales superóxido (Lodi *et al.*, 2008; Lodi *et al.*, 2009). Estos datos indican por primera vez que los metabolitos de la quercetina podrían ser los responsables de la actividad protectora de la quercetina sobre la función endotelial y la presión arterial, cuando se administra *in vivo*. Por otra parte, es también posible que los metabolitos presentes en plasma no sean representativos de los compuestos a nivel intracelular, ya que las formas libres se acumulan en membranas biológicas y sus concentraciones son muy superiores a nivel intracelular que extracelular. Así, **el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral fue “analizar los efectos *in vitro* de los principales metabolitos conjugados de quercetina sobre el tono de las arterias de resistencia, determinar su patrón cinético en plasma tras su administración intravenosa y su correlación con el efecto *in vivo* sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas”.**

En forma de aglicón la quercetina muestra una tasa de absorción relativa alta (10-50%) (Hollman *et al.*, 1996) lo que se correlaciona con sus evidentes efectos *in vivo*, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Sin embargo, existe una gran variabilidad entre la cantidad de quercetina administrada y los niveles plasmáticos alcanzados de quercetina y sus metabolitos (Manach *et al.*, 2005). Es muy posible que, al menos en parte, estas diferencias tan marcadas sean debidas a la metodología analítica empleada para la detección de quercetina y metabolitos en plasma y las diferencias en el tiempo elegido para la toma de muestras. Pero en cualquier caso, es evidente que la biodisponibilidad varía en función de la fuente de quercetina empleada, es decir, si se administra quercetina pura, sus glicósidos o alimentos ricos en glicósidos de quercetina. Existen trabajos que indican que incluso la respuesta biológica puede variar de forma muy marcada dependiendo de la forma de administración de la quercetina. Así, tras la administración de quercetina (10 mg/kg/día) mediante una sonda gástrica a SHR, tal y como lo hemos llevado cabo en nuestros estudios previos, la quercetina presenta un claro efecto antihipertensivo (Duarte *et al.*, 2001b; Duarte *et al.*, 2001c). Sin embargo, una dosis muy superior incluida en el pienso de los animales (1,5 g por kg de pienso, que equivaldría a más de 120 mg/kg/día) no produjo ningún efecto sobre la presión arterial o la función endotelial (Carlstrom *et al.*, 2007). Estos datos sugieren que la forma de administración, en ausencia o asociada a alimentos, es un factor determinante en la biodisponibilidad de la quercetina. Por otro lado, parece muy posible que la distinta posología afecte también de manera marcada a la actividad biológica. Todo ello justifica **el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral: “determinar si la pauta de administración de la quercetina (dosis única diaria, dosis dividida en dos tomas diarias o administrada por vía intraperitoneal) modifica el perfil de biodisponibilidad y el metabolismo en SHRs y determinar la correlación entre el perfil farmacocinético y la actividad sobre la función endotelial y la presión arterial”**.



*Justification and aims*

---





Cardiovascular diseases are leading cause of death in occidental world and its prevalence continues growing (Murray and Lopez, 1997). For example, ischemic heart disease and stroke are responsible for almost one of third deaths in Europe. Drugs treatment, although partially effective, is clearly insufficient, thus requiring a preventive strategy aimed to reduce such risk factors early. There are non modifiable cardiovascular risk factors such as family history, sex, race or age. However, modifiable risk factors like cholesterol levels, hypertension, smoking, diabetes and poor dietary habits, represent a major contribution to cardiovascular morbidity and mortality (Greenland *et al.*, 2003).

Since the pioneering work of Hertog (Hertog *et al.*, 1993), several epidemiological studies have shown an inverse association between dietary flavonoid intake (flavonols plus flavones) and mortality from coronary heart disease (Knekt *et al.*, 1996; Rimm *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1997; Ness and Powles, 1997; Arai *et al.*, 2000; Hirvonen *et al.*, 2001). The presence of flavonoids in many plant foods may explain in part the beneficial effect of diets rich in fruits and vegetables. Furthermore, it has been suggested that flavonoids, including polyphenols present in wine, may be responsible for the *French paradox*, e.i., that means a low incidence of ischemic heart disease mortality in the French population (St Leger *et al.*, 1979; Renaud *et al.*, 1992; Truelsen *et al.*, 1998). Several flavonoids actions (Formica and Regelson, 1995) have been proposed to explain their beneficial effect on cardiovascular disease such as antioxidant (Rice-Evans *et al.*, 2002), vasodilator (Duarte *et al.*, 1993a; Perez-Vizcaino *et al.*, 2002) and antiaggregant effects (Gryglewski *et al.*, 1987). Furthermore, there are also indirect evidences that different flavonoids may protect against the damage to cellular macromolecules (lipids, proteins, DNA), supporting the possible role in the prevention of diseases, in which oxidative stress appears to be involved (Meydani, 2001). Flavonoids, particularly quercetin, have inhibitory activity on a wide variety of enzymes (Formica and Regelson, 1995; Middleton *et al.*, 2000). Therefore, the inhibition of

multiple signaling pathways results in changes in cell activity immediately and/or may interfere with cell proliferation and gene expression.

The average daily intake in the occidental diet of flavonols is estimated to be approximately 23 mg, with quercetin contributing 60-75% of the total (Hertog *et al.*, 1993; Sampson *et al.*, 2002). The average intake of flavan-3-ols is within a similar range, in amounts ranging from 28-31mg, with (+)-catechin (henceforth referred to as catechin) and epicatechin being the most abundant (Manach *et al.*, 2004). The profiles of biological effects show marked differences among the different classes of flavonoids (Loke *et al.*, 2010). For example, flavonols exert a systemic and coronary vasodilatation (Duarte *et al.*, 1993b; Ibarra *et al.*, 2002), while catechins exhibit a weak vasodilator effect (Duarte *et al.*, 1993b). Both flavonoid groups show antioxidant effects *in vitro* and can prevent endothelial dysfunction *in vivo* (Duarte *et al.*, 2001b; Ihm *et al.*, 2009). Due to their ubiquitous distribution, flavonoids from different classes are commonly present together in foods and/or are consumed in the same meal. In fact, prototypical flavonoid-rich foods contain a large number of different flavonoids in variable amounts. However, little is known about the possible interactions between them and their underlying mechanisms. Quercetin and catechin have been reported to act synergistically in reducing platelet recruitment via inhibition of protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation (Pignatelli *et al.*, 2000; Pignatelli *et al.*, 2006), this effect could also take place at the vascular level. Pharmacokinetic interaction has also been described, observing that the co-administration of both flavonoids change their absorption, but not their metabolism (Silberberg *et al.*, 2005). Therefore, ***the first aim of this Doctoral Thesis was to “analyze interaction between quercetin and catechin, the representative compounds of the two major classes of flavonoids, on the prevention of endothelial dysfunction *in vitro* and, if so to determine the involved mechanisms”.***

Once quercetin is absorbed through the gastrointestinal tract, is rapidly metabolized by methylation and conjugation with glucuronic acid and/or sulfate in the enterocytes and, additionally, in the liver (Manach *et al.*, 1998; Scalbert and Williamson, 2000). These conjugated metabolites present a long half-life (~24 h) and accumulate in plasma after repeated daily dosage (Hollman *et al.*, 1996). The major metabolites of quercetin in human plasma are (Williamson *et al.*, 1996; Plumb *et al.*, 1997; Manach *et al.*, 1998; Plumb *et al.*, 1999; Erlund *et al.*, 2000; Scalbert and Williamson, 2000; Graefe *et al.*, 2001; DuPont *et al.*, 2002; Nemeth *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2001) quercetin-3-O-glucuronide (Q3GA), quercetin-3'-O-sulfate (Q3'S) and isorhamnetin-3-O-glucuronide (I3GA) and quercetin-diglucuronide incompletely characterized, accompanied by minor amounts of quercetin-4'-glucuronide and isorhamnetin. The quercetin methylation to form isorhamnetin (3'-methylether of quercetin) is an important process in its metabolism. Isorhamnetin could be important to explain some of associated effects with quercetin intake, since it has a longer half-life and a more powerful vasodilator effect in resistance arteries (Perez-Vizcaino *et al.*, 2002). However, the plasma concentrations of free quercetin and isorhamnetin are very low, which is known as the *flavonoids paradox*, thus a huge amount of scientific data generated along decades with the unconjugated compounds *in vitro* have been questioned and raises the doubt of which are the compounds responsible for biological activity, and suggests that the conjugated metabolites may play an important role in these beneficial effects.

The nature and number of substituents of phenolic hydroxyl groups have profound effects on the properties of free radical scavengers, on the enzymatic activity and vasodilator effects of quercetin (Duarte *et al.*, 1993b; Williamson *et al.*, 1996; Plumb *et al.*, 1997; Plumb *et al.*, 1999), so the type of circulating conjugated metabolites is crucial to explain its biological activity. However, available data about quercetin metabolites activity are scarce. Recent studies have shown that the major quercetin metabolites in human plasma (Q3GA, Q3'S and I3GA) generally show

weaker effects *in vitro* than the free genin (Lodi *et al.*, 2008; Lodi *et al.*, 2009; Winterbone *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010). It has been described Q3GA inhibits JNK activity and prevents vascular hypertrophy (Yoshizumi *et al.*, 2002). We have also observed that unlike ishoramnetin and quercetin, quercetin metabolites have no direct vasodilator effect. Furthermore, these metabolites do not undergo auto-oxidation processes, do not generate free radicals and do not inhibit the biological activity of NO. However, they are able to inhibit NADPH oxidase activity and superoxide radical capture (Lodi *et al.*, 2008; Lodi *et al.*, 2009). For the first time, these data indicate that quercetin metabolites may be the responsible of the protective activity on endothelial function and blood pressure when quercetin is administered *in vivo*. Moreover, it is also possible plasma metabolites are not representative of the compounds to the intracellular level, because the free forms accumulate itself in biological membranes and their concentration are significantly higher intra than extra-cellular. Thus **the second objective of this Doctoral Thesis was to “analyze the in vitro effects of the major conjugated metabolites of quercetin on the tone of mesenteric resistance arteries and also to determine its kinetic pattern in plasma after intravenous (iv) administration and its correlation with the in vivo effect on blood pressure in SHRs”.**

Shaped aglycon quercetin shows an absorption rate relatively high (10-50%) (Hollman *et al.*, 1996) which correlates with its obvious effects *in vivo*, as described in previous sections. However, there is great variability between the amount of quercetin administered and plasma levels achieved quercetin and its metabolites (Manach *et al.*, 2005). It is quite possible that, at least in part, these marked differences are due to the analytical methodology used for the detection of quercetin and its metabolites in plasma and the differences in time sampling. But in any case, it is apparent that the bioavailability varies depending on the source of quercetin employed, i.e., if administered pure quercetin, its glycosides or glycoside rich-foods quercetin. Different studies indicate that the biological response can vary markedly depending on the mode

of quercetin administration. Thus, after oral gavage quercetin administration (10 mg/kg/d) to SHR, as we carried out in our previous studies, quercetin exerts a clear antihypertensive effect (Duarte *et al.*, 2001b; Duarte *et al.*, 2001c). However, higher dose included in animal feed (1.5 g per kg of feed, equivalent to more than 120 mg/kg/d) had no effect on blood pressure or endothelial function (Carlstrom *et al.*, 2007). These data suggest that the administration procedure, in the absence or in association with food, is a determining factor in the quercetin bioavailability. On the other hand, it seems likely that the different dosage regimens also affect the biological activity. This justifies **the *third objective of this Doctoral Thesis*: "to analyze whether different dosage regimens of quercetin (one or two daily oral doses or one ip dose) modifies the bioavailability and metabolite profile in SHRs and determine the correlation between the pharmacokinetic profile and activity on endothelial function and blood pressure"**.



## *Artículos de Investigación*

---





## **ARTÍCULO 1**

### **Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle**

Carmen Menéndez, Rosario Jimenez, Laura Moreno,  
*Pilar Galindo*, Angel Cogolludo, Juan Duarte and  
Francisco Perez-Vizcaino.

British Journal of Nutrition (2011)

**105:1287-1293.**



## Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle

Carmen Menendez<sup>1,2</sup>, Rosario Jimenez<sup>3</sup>, Laura Moreno<sup>1,2</sup>, Pilar Galindo<sup>3</sup>, Angel Cogolludo<sup>1,2</sup>, Juan Duarte<sup>3</sup> and Francisco Perez-Vizcaino<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES), 28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

(Received 28 April 2010 – Revised 5 October 2010 – Accepted 1 November 2010 – First published online 10 December 2010)

### Abstract

Due to their ubiquitous distribution, flavonoids from different classes are commonly present together in foods. However, little is known about the interactions between them. The flavonol quercetin and the flavan-3-ol (+)-catechin are among the most abundant flavonoids in the diet. In the present study, we have analysed the interactions between these two flavonoids on vascular function using two pure compounds and mixtures of these flavonoids in 1:0.1, 1:1 or 1:10 proportions. Quercetin induced a more potent concentration-dependent relaxant effect than catechin in the isolated rat aorta, and the isobolographic analysis of the mixtures showed no synergistic or antagonistic effects between them, i.e. their effects were additive. Quercetin was more potent in mesenteric than in pulmonary arteries. Catechin had weak effects in these vessels and did not modify the effects of quercetin. Endothelial dysfunction induced by increased oxidative stress by the superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate was prevented by quercetin, whereas catechin showed a weak effect and the 1:1 mixture an intermediate effect compared with the pure compounds. Quercetin but not catechin showed a pro-oxidant and NO-scavenging effect, which was not prevented by catechin. In conclusion, catechin was less potent than quercetin as a vasodilator, pro-oxidant or to prevent endothelial dysfunction, and there were no synergistic interactions between quercetin and catechin.

**Key words:** Quercetin: Catechin: Isobologram: Endothelium

Flavonoids are polyphenolic compounds ubiquitously distributed in plants and are consumed regularly in the diet in considerable amounts in the form of fruits, vegetables, nuts and derived products such as red wine, tea and chocolate. Based on their chemical structure, flavonoids can be classified into several subclasses such as flavonols, flavones, flavanones, flavan-3-ols (also referred to as catechins), anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols and chalcones. Flavan-3-ols and flavonols are the most abundant and are widely distributed in food. The average daily intake in the occidental diet of flavonols is estimated to be approximately 20–25 mg, with quercetin contributing 60–75% of the total<sup>(1,2)</sup>. The average intake of flavan-3-ols is within a similar range (approximately 18–31 mg), with (+)-catechin (henceforth referred to as catechin) and epicatechin being the most abundant<sup>(3)</sup>.

Prospective epidemiological studies have shown an inverse correlation between dietary flavonoid intake and mortality from CHD<sup>(1,2)</sup>. Several studies using various animal models have provided support for the observed protective effects of dietary flavonoids with respect to CVD<sup>(4–6)</sup>. However, the

profiles of biological effects show marked differences among the different classes of flavonoids<sup>(7)</sup>. For example, flavonols exert systemic and coronary vasodilatation<sup>(8,9)</sup>, while catechins exhibit a weak vasodilator effect<sup>(8)</sup>. Both flavonoid groups show antioxidant effects *in vitro* and can prevent endothelial dysfunction *in vivo*<sup>(10,11)</sup>.

Due to their ubiquitous distribution, flavonoids from different classes are commonly present together in foods and/or are consumed in the same meal. In fact, prototypical flavonoid-rich foods contain a large number of different flavonoids in variable amounts. However, little is known about the interactions between them. Quercetin and catechin have been reported to act synergistically in reducing platelet recruitment via the inhibition of protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation<sup>(12,13)</sup>. Pharmacokinetic interactions have also been described<sup>(14)</sup>.

In the present study, we have analysed the interactions between quercetin and catechin, the representative compounds of the two major classes of flavonoids, on vascular function *in vitro*.

**Abbreviations:** DETCA, diethyldithiocarbamate; DHE, dihydroethidium.

\* **Corresponding author:** F. Perez-Vizcaino, email fperez@med.ucm.es

## Experimental methods

The present study was conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and approved by our Institutional Committee (Comité de de Experimentación animal, Universidad Complutense) for the ethical care of animals. Male Wistar rats were obtained from Harlan Laboratories.

### Materials and solutions

All drugs and chemicals were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Flavonoids were dissolved in dimethyl sulphoxide, and all the other compounds were dissolved in distilled, deionised water. Quercetin–catechin mixtures were prepared by mixing the stock solutions, and the concentrations of mixtures are expressed as the sum of both, e.g. a 10  $\mu\text{M}$ –quercetin–catechin (1:10) mixture contains 0.91  $\mu\text{M}$ –quercetin and 9.09  $\mu\text{M}$ –catechin. To prepare the NO solutions used for biological activity, a vial containing 20 ml of Krebs solution at 37°C was initially bubbled with N<sub>2</sub> for 15 min and then continuously bubbled with NO (450 parts per million from Air Liquide España, Paris, France), resulting in a concentration of 0.9–1  $\mu\text{M}$  (as measured by an ISO-NO meter electrochemical electrode; WPI, Stevenage, Herts, UK). The Krebs solution contained 118 mM–NaCl, 4.75 mM–KCl, 25 mM–NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM–MgSO<sub>4</sub>, 2 mM–CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11 mM–glucose. The HEPES-buffered solution contained 130 mM–NaCl, 5 mM–KCl, 1.2 mM–MgCl<sub>2</sub>, 10 mM–glucose and 10 mM–HEPES (pH adjusted to 7.4 with NaOH).

### Auto-oxidation

Absorption spectra of quercetin and catechin in the Krebs solution, bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, pH 7.4, were analysed in a spectrophotometer (6405; Jenway, Bio-World, Bibby Scientific Ltd, Staffs, UK)<sup>(15)</sup>. Spectra were obtained just after dilution and at 10, 20, 60 and 120 min.

### Nitric oxide scavenging

NO was monitored with the ISO-NO meter in a 20 ml chamber at 37°C filled with the HEPES-buffered solution as described previously<sup>(15)</sup>. At the beginning of the experiment, the system was closed with no headspace; under constant rapid stirring, NO concentration was approximately 100 nM and O<sub>2</sub> concentration was 20%, and the pH was 7.4.

### Aortic contractile tension recording

Thoracic aortic rings (3 mm in length) from Wistar rats were mounted in organ chambers for isometric force recording<sup>(16)</sup>. In some experiments, aortae were mechanically denuded of endothelium by rubbing the luminal surface with a metal rod. Aortic rings were stretched to 2 g of tension and equilibrated for 90–120 min. During this period, Krebs solution was changed every 30 min, and the rings were re-stretched

as needed to maintain a final tension of 2 g. Endothelium denudation was confirmed by the absence of a relaxant response to acetylcholine (<10%). To analyse the effects on endothelial function and its inhibition by the superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate (DETCA), endothelium-intact rings were pre-incubated in the absence or presence of DETCA (1 mM) and with vehicle (dimethyl sulphoxide 0.1%), quercetin, catechin or the quercetin–catechin mixture (1:1; 10  $\mu\text{M}$ ) for 10 min. After stimulation with phenylephrine (100 nM), a concentration–response curve analysis to acetylcholine was performed.

### Contraction in mesenteric and pulmonary resistance arteries

Mesenteric and pulmonary arterial rings (internal diameter 300–500  $\mu\text{m}$ ) were mounted in a wire myograph in Krebs solution and stretched to give an equivalent transmural pressure of 100 mmHg<sup>(17)</sup>. After equilibration, arteries were exposed to U46619 (0.1  $\mu\text{M}$ ), and after a steady-state constrictor response was obtained, the flavonoids quercetin, catechin or their mixtures were added cumulatively. The NO synthase inhibitor G-nitro-L-arginine-methyl ester (0.1 mM) was added at the end of the experiment to test the reversal of flavonoid-induced relaxation.

### Pro-oxidant effect in rat aortic smooth muscle cells in culture

Primary cultures of smooth muscle cells were prepared from rat aortic explants as described previously<sup>(18)</sup>. Dihydroethidium (DHE) enters the cells and is oxidised by superoxide to yield ethidium, which binds to DNA to produce bright red fluorescence. Cells cultured in ninety-six-well plates (passages 2–3) were incubated in HEPES-buffered solution containing DHE (10  $\mu\text{M}$ ) at 37°C for 30 min, and then exposed for another 30 min to various concentrations of quercetin, catechin or their mixtures. DHE fluorescence was read in a fluoroskan fluorometer (Thermoscientific, Madison, WI, USA). Excitation and emission were filtered at 530 and 620 nm, respectively).

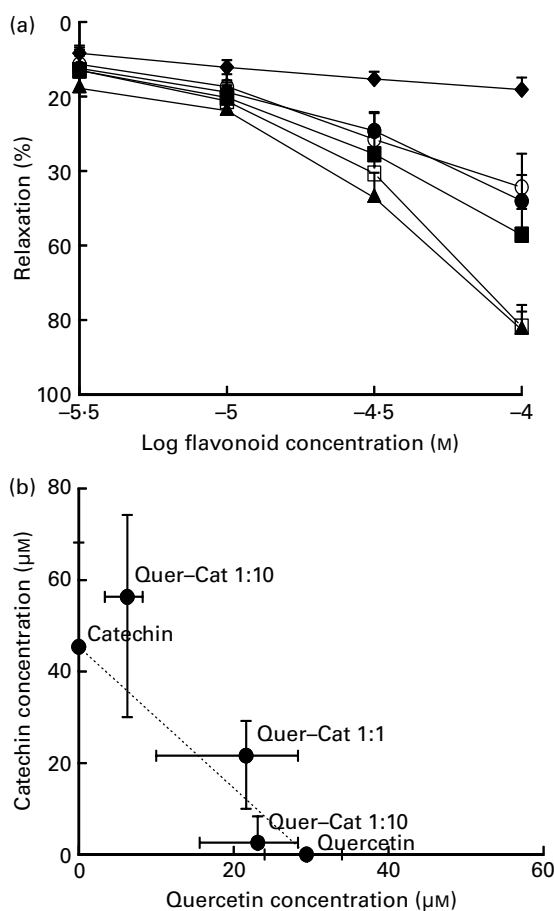
### Statistical analysis

Results are expressed as means with their standard errors, and *n* describes the number of measurements made from different animals. Differences between experimental groups were analysed using the unpaired Student's *t* test or, for multiple comparisons, using one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. *P* values <0.05 were considered statistically significant. Individual cumulative concentration–response curves were analysed, and IC<sub>30</sub>, i.e. the concentration producing a relaxation of 30% of the previous tone, was calculated. For the isobolographic analysis, the calculated IC<sub>30</sub> value of quercetin or catechin reflected the estimated concentration present in the mixture when a relaxation of 30% was achieved.

## Results

### Vasodilator effects in the rat aorta

As reported previously, quercetin-induced a concentration-dependent relaxant effect (Fig. 1(a)). Catechin was less potent, and the 50% relaxation was not achieved at the maximal concentration (100  $\mu\text{M}$ ) tested. The 1:0.1 quercetin–catechin mixture (90.9% quercetin and 9.1% catechin) produced an effect similar to quercetin, and the 1:10 mixture (9.1% quercetin and 90.9% catechin) produced a similar effect to catechin. To analyse the interactions between the two compounds, we performed an isobolographic analysis<sup>(19,20)</sup> from the data shown in Fig. 1(a) by plotting the  $\text{IC}_{30}$  values of the



**Fig. 1.** Quercetin (Quer) and catechin (Cat) induce additive vasodilatory effects. Vasorelaxant responses induced by quercetin, catechin and the 1:0.1, 1:1 and 1:10 quercetin–catechin mixtures in the endothelium-denuded rat aorta stimulated with noradrenaline (1  $\mu\text{M}$ ). (a) Cumulative concentration–response curves. The concentrations of the mixtures are expressed as the sum of both compounds, e.g. in the 1:0.1 quercetin–catechin mixture at 10  $\mu\text{M}$  ( $\log[\text{quercetin } 1-0.1] = -5$ ), the concentrations of each compound are 9.09  $\mu\text{M}$  for quercetin and 0.91  $\mu\text{M}$  for catechin.  $\circ$ , Catechin;  $\square$ , quercetin;  $\blacktriangle$ , Quer–Cat 1:0.1;  $\blacksquare$ , Quer–Cat 1:1;  $\bullet$ , Quer–Cat 1:10;  $\blacklozenge$ , DMSO. (b) Isobologram for the interaction between quercetin and catechin in causing relaxation in endothelium-denuded aortic rings. Each point represents the estimated concentration of the drug present in the mixture when a 30% relaxation is achieved, calculated from the data in (a). Results are means from six to eight experiments (except dimethyl sulphoxide (DMSO), where  $n=3$ ) with standard errors represented by vertical bars. The dotted line represents the line of additivity; deviations above and below the line would show negative and positive interactions, respectively.

pure compounds and their mixtures (Fig. 1(b)). The dotted line in this figure represents the line of additivity, so that deviations above and below this line indicate negative and positive interactions, respectively. It can be observed that the points of the quercetin–catechin mixtures were not significantly different from the line of additivity, indicating that there were no interactions between the two flavonoids, i.e. their effects were additive.

### Vasodilator effects in mesenteric and pulmonary resistance arteries

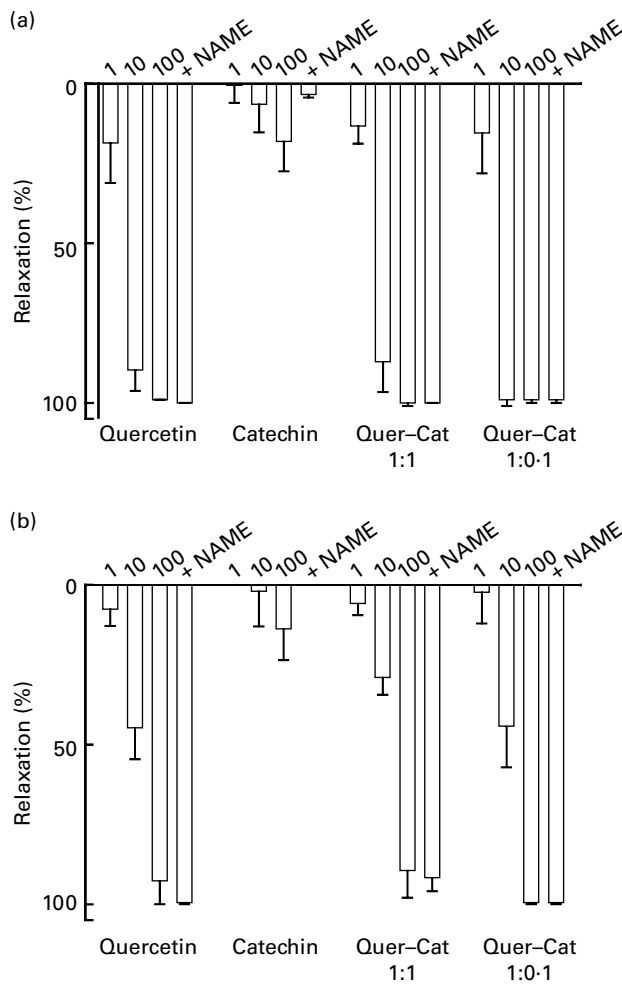
In endothelium-intact small arteries mounted in a myograph, the contractile responses were not as sustained as in the aortae, i.e. after 70–90 min, the tone usually declined by more than 30%. Therefore, only three concentrations of the flavonoids (1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ) could be tested. As expected<sup>(21)</sup>, quercetin produced a stronger relaxant response in the small arteries than in the aorta that was also significantly more potent in systemic (mesenteric) than in pulmonary arteries, with 10  $\mu\text{M}$  producing approximately 90 and 50% relaxation, respectively (Fig. 2). Addition of G-nitro-L-arginine-methyl ester at the end of the experiment could not reverse the vasodilator effects of quercetin. In contrast, 100  $\mu\text{M}$ -catechin produced only approximately 20% relaxation in both arteries. Despite the use of only three concentrations and the weak effect of catechin precluded the isobolographic analysis of the interactions, the results obtained suggest the lack of the interaction between the two flavonoids, e.g. the 1:0.1 quercetin–catechin mixture produced effects similar to those of quercetin, and the effects of the 1:1 mixture were weakly less pronounced than those of quercetin in pulmonary arteries.

### Effects on endothelial function and dysfunction

In endothelium-intact aortic rings pre-contracted with phenylephrine, acetylcholine induced a relaxant response due to the endothelial release of NO. In the presence of quercetin, catechin or the 1:1 quercetin–catechin mixture at 10  $\mu\text{M}$ , this relaxant response was unaffected (Fig. 3(a)). The  $\text{Cu}^{2+}$  chelator DETCA (1 mM) increases superoxide by inhibiting endogenous Cu/Zn superoxide dismutase activity and hence induces NO inactivation. As expected, DETCA induced a marked impairment of endothelial-derived NO response as indicated by the reduction in the relaxant response to acetylcholine (Fig. 3(b)). Under these conditions, 10  $\mu\text{M}$ -quercetin increased acetylcholine-induced relaxation, i.e. it prevented oxidative stress-induced endothelial dysfunction. Catechin produced a weak, borderline significant ( $P=0.06$ ) increase, and the 1:1 quercetin–catechin mixture produced an intermediate effect between the pure compounds.

### Pro-oxidant and nitric oxide-scavenging effects in cell-free systems

Quercetin is oxidised in aqueous buffers, generates superoxide and inactivates  $\text{NO}^{(15)}$ . Its oxidation can be monitored by the changes in UV spectra, i.e. an increase in absorbance



**Fig. 2.** Vasorelaxant responses induced by quercetin (Quer), catechin (Cat) and the 1:0.1 and 1:1 quercetin–catechin mixtures in (a) mesenteric and (b) pulmonary resistance arteries stimulated with U46619 (100 nM). After the last concentration of the flavonoids, the nitric oxide synthase inhibitor G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME; 0.1 mM) was added to test the possible reversion of flavonoid-induced vasodilation. Results are means from five to eight experiments, with standard errors represented by vertical bars.

at 320 nm and a decrease at 385 nm. Catechin (10 μM), which has negligible absorbance in this wavelength range, was not able to prevent the oxidation of quercetin in the media (data not shown). Fig. 4(a) shows the inactivation of NO induced by quercetin. In contrast, the rate of decay of NO in the presence of catechin was similar to that observed in the presence of the vehicle dimethyl sulphoxide. Moreover, catechin did not alter the NO-scavenging effect induced by quercetin (Fig. 4(b)).

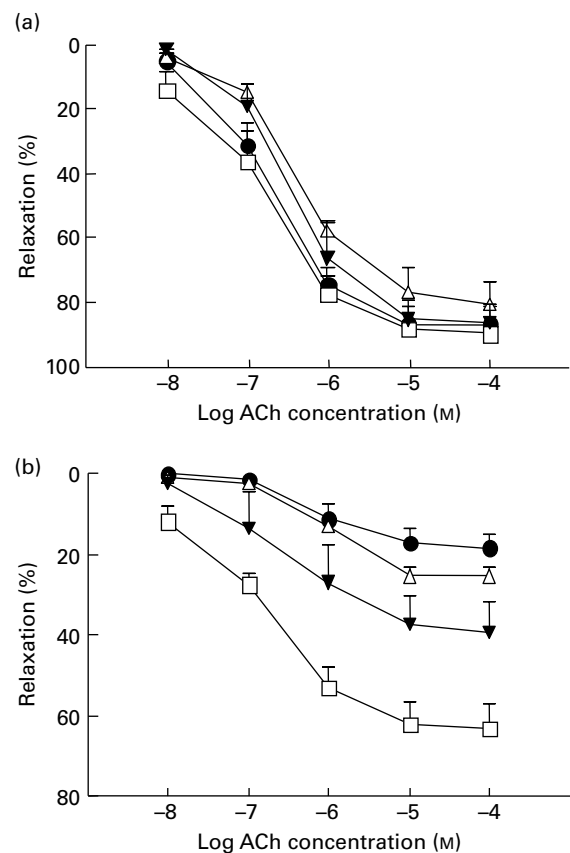
#### Pro-oxidant effect in cultured aortic smooth muscle cells

In the absence of DHE, neither 30 μM-quercetin nor 100 μM-catechin induced any change in red fluorescence. Addition of quercetin to aortic smooth muscle cells produced a concentration-dependent increase in DHE red fluorescence, indicating an increase in intracellular superoxide (Fig. 5). In contrast, catechin produced a negligible effect (not significant

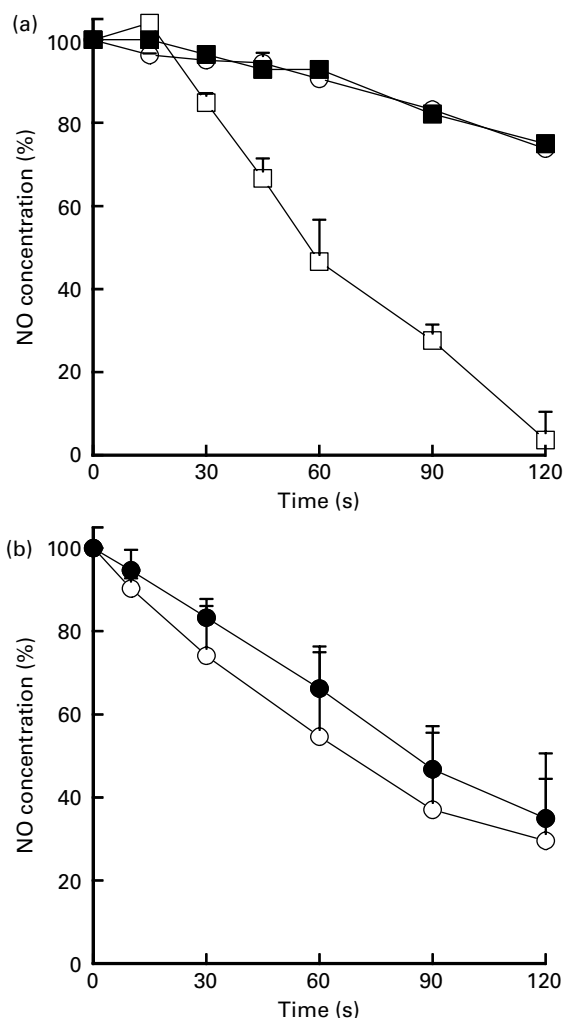
compared with dimethyl sulphoxide) at concentrations up to 100 μM. The 1:10 quercetin–catechin mixture produced a concentration-dependent increase in DHE fluorescence. This latter effect was equivalent to that produced by one-tenth of pure quercetin, e.g. 100 μM of the mixture containing 9.1 μM of quercetin produced an effect similar to 10 μM of pure quercetin, indicating that catechin does not interfere with the pro-oxidant effects of quercetin in smooth muscle cells.

#### Discussion

Endothelial, smooth muscle cells and platelets are three main targets for the actions of flavonoids regarding CVD. A synergistic interaction between catechin and quercetin to inhibit platelet aggregation has been described<sup>(12,13)</sup>. In the present study, we show that compared with quercetin, catechin produced weak vasodilator effects in conductance and resistance arteries, a weak ability to modulate oxidative stress-induced endothelial dysfunction and did not show pro-oxidant effects. Importantly, catechin did not influence the effects of quercetin on these parameters.



**Fig. 3.** (a) Effects of quercetin, catechin and the 1:1 quercetin–catechin (Quer–Cat) mixture on the endothelium-dependent vasorelaxation of acetylcholine (ACh) under control conditions and (b) after inducing endothelial dysfunction with the superoxide dismutase inhibitor diethylthiocarbamate. Endothelium-intact aortic rings were treated for 10 min with the flavonoids (10 μM), then stimulated with phenylephrine (100 nM), and a concentration–response curve to ACh (0.01–100 μM) was carried out in a cumulative fashion. Results are means of five to eight experiments, with standard errors represented by vertical bars. ●, Dimethyl sulphoxide (DMSO); □, quercetin; △, catechin; ▼, Quer–Cat 1:1.



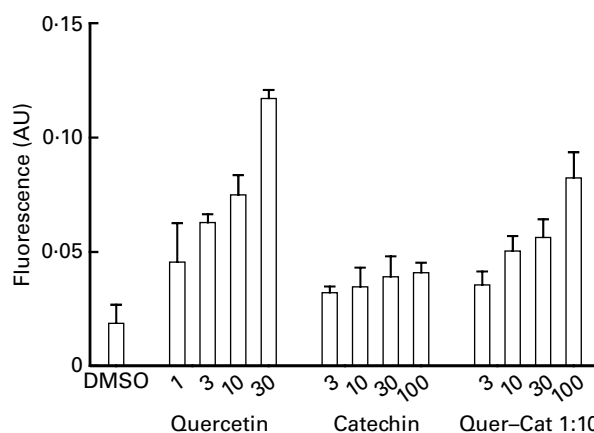
**Fig. 4.** Catechin does not scavenge nitric oxide and does not prevent quercetin-induced nitric oxide scavenging. (a) Time-course of nitric oxide decay in the presence of quercetin (□), catechin (○) and 0.1% dimethyl sulphoxide (DMSO (■); vehicle). (b) Nitric oxide decay induced by quercetin in the presence of DMSO (vehicle) (●) and catechin (○). Results are means of three experiments, with standard errors represented by vertical bars.

A direct endothelium-independent vasodilator effect of flavonols is one of the potential mechanisms involved in their anti-hypertensive effects, which might also contribute to prevent other forms of CVD such as IHD and stroke. Interestingly, quercetin is a more potent vasodilator in smaller arteries, which is involved in the control of vascular resistance and therefore regulates tissue flow and blood pressure<sup>(21)</sup>. This difference may reflect the diverse signalling involved in the contraction in large and small arteries. Recently, pulmonary arterial pressure has been implicated as a cardiovascular risk factor<sup>(22)</sup>. Herein, we report for the first time that quercetin also relaxes pulmonary resistance arteries. However, the vasodilator potency of quercetin was higher in pulmonary than in the aorta but yet lower than in systemic (mesenteric) resistance arteries, indicating a low selectivity for the pulmonary circulation. In contrast, catechin had a weak vasodilator effect. Despite some structural similarities between catechin and quercetin, the latter is planar but the former is not,

which may explain some of the differences found in the biological activity. Moreover, catechin did not modify the vasodilator effects of quercetin in the three vessels studied. In the aorta, the isobolographic analysis revealed that the effects of both flavonoids were additive.

The mechanisms of drug interactions (synergism, additivity or antagonism) are most often analysed intuitively, without a proper mathematical method. The isobolographic analysis is an easy and appropriate method for the study of drug–drug interactions when both drugs show activity<sup>(20)</sup>. In the aorta, the isoblogram revealed that the vasodilator effects of both flavonoids were additive because the points for their combinations were near the line of additivity (within the standard errors of the points). In mesenteric and pulmonary arteries, the isoblogram could not be plotted because of the weak effect of catechin. However, the data also suggest a lack of interaction.

Endothelial dysfunction is an early and independent predictor of poor prognosis in most forms of CVD. One of the key mechanisms of endothelial dysfunction involves the vascular production of reactive oxygen species, particularly superoxide derived from NADPH oxidase, which reacts rapidly with NO and induces NO inactivation. Quercetin restores the impaired endothelial function *in vitro*<sup>(23)</sup> and *in vivo* in several animal models of hypertension<sup>(24)</sup> by at least two mechanisms. Acutely, quercetin directly scavenges superoxide and inhibits the activity of superoxide-generating enzymes. In the chronic phase, quercetin can prevent the expression of genes involved in superoxide generation such as the NADPH oxidase subunits induced by pathological stimuli such as angiotensin II or endothelin-1. Herein, we used a protocol to induce acute endothelial dysfunction based purely on oxidative stress by means of inhibiting the degradation of endogenous superoxide. Compounds scavenging intracellular superoxide or inhibiting the synthesis are expected to protect this (and possibly other) form of endothelial dysfunction. Catechin at



**Fig. 5.** Intracellular superoxide generation in aortic smooth muscle cells in primary culture. Cells incubated with the red fluorescent dye dihydroethidium were exposed to different concentrations of quercetin, catechin and the 1:10 quercetin–catechin (Quer–Cat) mixture. Fluorescence was measured at 30 min. Results are means of two to three experiments performed in triplicate, with standard errors represented by vertical bars. AU, arbitrary units; DMSO, dimethyl sulphoxide.



physiologically relevant concentrations of 10  $\mu\text{M}$  had a weak protective effect on the impairment of acetylcholine-induced relaxation by DETCA. The combination of catechin and quercetin both at 5  $\mu\text{M}$  produced less effective protection than 10  $\mu\text{M}$ -quercetin, ruling out a synergistic interaction between the two compounds.

Antioxidants often also show pro-oxidant effects when analysed under specific experimental conditions. In fact, besides the antioxidant effect, flavonoids also show pro-oxidant effects<sup>(15,25)</sup>, which may be involved in some of their biological properties. Under certain experimental conditions, the generation of superoxide by quercetin can scavenge NO and hence reduce NO-induced vasodilation<sup>(15)</sup>. In addition, the activation of large conductance potassium channels by quercetin involves the generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>(26)</sup>, and this effect contributes at least partially to the coronary vasodilator effect. Quercetin is auto-oxidised and generates superoxide that rapidly reacts with NO<sup>(15)</sup>. In contrast, catechin at 10  $\mu\text{M}$  lacked NO-scavenging effects. The effects of quercetin on NO can be prevented by superoxide scavengers such as superoxide dismutase. It could be expected that catechin could prevent the effects of quercetin via an antioxidant effect. However, at least at this concentration of 10  $\mu\text{M}$ , catechin did not prevent quercetin auto-oxidation nor the NO-scavenging effect. Intracellular reactive oxygen species can be detected by using fluorescent dyes such as DHE, which detects superoxide, or dichlorofluorescein, which detects mainly  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Confirming our previous report using dichlorofluorescein in coronary arteries<sup>(26)</sup>, in the present study, we also found that quercetin increases intracellular reactive oxygen species in aortic smooth muscle. Consistent with a weak NO-scavenging effect in cell-free systems, catechin did not significantly increase intracellular superoxide. Synergistic effects of polyphenolic mixtures (including catechin, quercetin, hesperidin and ferulic acid) in preventing human LDL oxidation have been found<sup>(27)</sup>. However, catechin alone did not prevent the pro-oxidant effect of quercetin either in cell-free systems or in cultured smooth muscle cells.

A limitation of the present study is that the concentration range of plasma quercetin levels in human subjects consuming flavonoid-rich foods is 0.3–7.6  $\mu\text{M}$ <sup>(28)</sup>, which is below the range of effective concentrations used herein (1  $\mu\text{M}$  had almost no effect and 10  $\mu\text{M}$  had almost full inhibitory effect in the mesentery). Moreover, quercetin is mostly present in the plasma in the form of glucuronidated and sulphated metabolites<sup>(28)</sup>, which lack a direct acute vasorelaxant effect<sup>(29)</sup>. Recent evidence has suggested that glucuronides deconjugate and the free quercetin (aglycone) is accumulated in cells at variable concentrations<sup>(30)</sup>, but its biological relevance is yet unknown.

In conclusion, the present *in vitro* study shows that catechin has weak effects on vascular function acutely and, when present, its effects are additive with those of quercetin, excluding synergistic interactions of these two flavonoids at this level.

## Acknowledgements

The present study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-06685, SAF2008-03948, Red HERACLES RD06/0009 and C. Menendez FPI studentship), Junta de Andalucía (P06-CTS-01555 and R. Jimenez 'Retorno de Doctores' contract) and Mutua Madrileña. The authors are grateful to Enrique Moreno and Bianca Barreira for their excellent technical assistance. The authors declare no conflicts of interest. F. P.-V. and J. D. designed the experiments, F. P.-V. wrote the manuscript, and all others, especially C. M., performed and analysed the experiments and contributed to the discussion.

## References

- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, *et al.* (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**, 1007–1011.
- Sampson L, Rimm E, Hollman PC, *et al.* (2002) Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* **102**, 1414–1420.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–747.
- Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F, *et al.* (2006) The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 919–925.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J & Andriantsitohaina R (2006) Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* **40**, 1054–1065.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, *et al.* (2009) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* **61**, 67–75.
- Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, *et al.* (2010) Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 749–757.
- Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, *et al.* (1993) Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure–activity relationships. *Gen Pharmacol* **24**, 857–862.
- Ibarra M, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, *et al.* (2002) Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med* **68**, 307–310.
- Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, *et al.* (2001) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **133**, 117–124.
- Ihm SH, Lee JO, Kim SJ, *et al.* (2009) Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis* **206**, 47–53.
- Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, *et al.* (2000) The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr* **72**, 1150–1155.
- Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, *et al.* (2006) Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J* **20**, 1082–1089.

14. Silberberg M, Morand C, Manach C, *et al.* (2005) Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci* **77**, 3156–3167.
15. Lopez-Lopez G, Moreno L, Cogolludo A, *et al.* (2004) Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* **65**, 851–859.
16. Jimenez R, Andriambelison E, Duarte J, *et al.* (1999) Involvement of thromboxane A<sub>2</sub> in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* **127**, 1539–1544.
17. Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, *et al.* (2009) Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **82**, 296–302.
18. Lodi F, Jimenez R, Moreno L, *et al.* (2008) Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* **204**, 34–39.
19. Perez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Zaragoza-Arnaez F, *et al.* (1999) Vasodilator effects of sodium nitroprusside, levcromakalim and their combination in isolated rat aorta. *Br J Pharmacol* **128**, 1419–1426.
20. Tallarida RJ (2001) Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 865–872.
21. Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, *et al.* (2002) Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 66–72.
22. Lam CS, Borlaug BA, Kane GC, *et al.* (2009) Age-associated increases in pulmonary artery systolic pressure in the general population. *Circulation* **119**, 2663–2670.
23. Sanchez M, Lodi F, Vera R, *et al.* (2007) Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr* **137**, 910–915.
24. Sanchez M, Galisteo M, Vera R, *et al.* (2006) Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **24**, 75–84.
25. Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys* **476**, 107–112.
26. Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM, *et al.* (2007) The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res* **73**, 424–431.
27. Cirico TL & Omaye ST (2006) Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol* **44**, 510–516.
28. Manach C, Williamson G, Morand C, *et al.* (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 230S–242S.
29. Lodi F, Jimenez R, Moreno L, *et al.* (2008) Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* **204**, 34–39.
30. Bieger J, Cermak R, Blank R, *et al.* (2008) Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr* **138**, 1417–1420.

## **ARTÍCULO 2**

### **Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: The flavonoid paradox revealed?**

Carmen Menéndez, Montserrat Dueñas, *Pilar Galindo*,  
Susana González-Manzano, Rosario Jimenez, Laura  
Moreno, Maria José Zarzuelo, Isabel Rodríguez-Gómez,  
Juan Duarte, Celestino Santos-Buelga and Francisco  
Perez-Vizcaino.

Molecular Nutrition & Food Research (2011)  
**55:1780-1790.**



## RESEARCH ARTICLE

# Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: The flavonoid paradox revealed?

Carmen Menendez<sup>1,2\*</sup>, Montserrat Dueñas<sup>3\*</sup>, Pilar Galindo<sup>4</sup>, Susana González-Manzano<sup>3</sup>, Rosario Jimenez<sup>4</sup>, Laura Moreno<sup>1,2</sup>, María José Zarzuelo<sup>4</sup>, Isabel Rodríguez-Gómez<sup>5</sup>, Juan Duarte<sup>4</sup>, Celestino Santos-Buelga<sup>3</sup> and Francisco Perez-Vizcaino<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

<sup>2</sup> Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>5</sup> Department of Physiology, School of Medicine, Universidad de Granada, Granada, Spain

**Scope:** The dietary flavonoid quercetin exerts protective cardiovascular effects. Because quercetin is rapidly metabolized into less active or inactive glucuronidated metabolites and the plasma concentrations of free quercetin are very low, a huge amount of scientific data generated along decades with the unconjugated compounds *in vitro* has been questioned. We aimed to determine whether glucuronidated quercetin can deconjugate *in situ* and whether deconjugation leads to a biological effect.

**Methods and results:** Quercetin and quercetin-3-*O*-glucuronide (Q3GA) were perfused through the isolated rat mesenteric vascular bed. Quercetin was rapidly metabolized in the mesentery. In contrast, the decay of Q3GA was slower and was accompanied by a progressive increase of quercetin in the perfusate and in the tissue over 6 h, which was prevented by the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor saccharolactone. Incubation of mesenteric arterial rings mounted in a wire myograph with Q3GA for  $\geq 1$  h resulted in a significant inhibition of the contractile response which was also prevented by saccharolactone. Moreover, the intravenous administration of Q3GA resulted in a slow onset and sustained blood pressure lowering effect, demonstrating for the first time that Q3GA has effects *in vivo*.

**Conclusion:** We propose that Q3GA behaves as a quercetin carrier in plasma, which deconjugates *in situ* releasing the aglycone which is the final effector.

Received: June 6, 2011  
Revised: July 27, 2011  
Accepted: August 9, 2011

**Keywords:**

Blood pressure / Glucuronide / Metabolism / Quercetin / Vasodilation

## 1 Introduction

Quercetin is the most abundant and widely distributed flavonoid, a class of phenolic compounds consumed in the diet in fruits, vegetables, nuts and derived products such as red wine and chocolate. Prospective epidemiological studies

have shown an inverse correlation between dietary flavonoid intake and mortality from coronary heart disease [1–3]. These data are supported by multiple animal studies showing that quercetin and related flavonoids exert a wide range of biological effects both *in vitro* and *in vivo* [4]. Thus, they induce systemic and coronary vasodilatation and anti-aggregant effects *in vitro* [5–9] and reduce blood pressure, the oxidative status and the end-organ damage in animal models of hypertension [10].

One of the main difficulties in understanding the biological activity *in vivo* of flavonoids is their low concentration

**Correspondence:** Professor Francisco Perez-Vizcaino, Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

**E-mail:** fperez@med.ucm.es

**Fax:** +34-913941465

**Abbreviation:** Q3GA, quercetin-3-*O*-glucuronide

\*These authors contributed equally to this work.

in plasma where they are found as conjugated derivatives different to the forms present in food (i.e.  $\beta$ -glycosides and less frequently aglycones).  $\beta$ -Glycosides are mostly hydrolyzed in the intestines into the aglycones, which once absorbed are rapidly conjugated with glucuronic acid and/or sulfate during first-pass metabolism (intestine-liver) and a portion of the metabolites are also methylated [11–13]. Because the plasma concentrations of free quercetin and related flavonoids are very low, a huge amount of scientific data generated along decades [14] with the unconjugated compounds *in vitro* has been questioned [15, 16]. Recent studies have shown that the major metabolites of quercetin in human plasma (quercetin-3-O-glucuronide [Q3GA], quercetin-3'-O-sulfate and isorhamnetin-3-O-glucuronide) show a much weaker *in vitro* effect, if any, than the parent compounds [17–20]. To our knowledge, the effects *in vivo* of the metabolites have not been analyzed so far.

We hypothesized that (i) Q3GA can deconjugate *in situ*, (ii) Q3GA exerts its effects *in vitro* via the release of quercetin and (iii) Q3GA exerts a blood pressure lowering effect.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animals

The present study was conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85–23, revised 1996) and approved by our Institutional Committee (Comité de Experimentación animal, Universidad Complutense #3011061) for the ethical care of animals. Male Wistar rats (250–300 g) were obtained from Harlan Laboratories.

### 2.2 Materials and solutions

Q3GA was isolated from green bean pods and stored as described [21] and all other drugs and chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Quercetin was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and all the other compounds were dissolved in distilled, deionized water. The Krebs solution contained 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11 mM glucose. The HEPES-buffered solution contained 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose and 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.4 with NaOH).

### 2.3 Isolated perfused mesentery of the rat

The isolated perfused mesentery of the rat was prepared as described [22]. Briefly, male albino Wistar rats were sacrificed, the abdomen opened and the ileocolic and colic

branches of the superior mesenteric artery ligated. The superior mesenteric artery was cannulated and the superior mesenteric vascular bed perfused for 5 min (2 mL/min) with HEPES buffer. Then, the intestine was separated from the mesentery and the preparation supported on an organ bath and the arteries perfused at a constant flow of 2 mL/min with warmed (37°C) HEPES buffer in a closed system with a total volume of 7 mL of HEPES buffer. After 5 min, quercetin or Q3GA were added to this recirculated-HEPES buffer in the absence or the presence of the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor D-saccharolactone (300  $\mu$ M) [23] or vehicle. Samples of 150  $\mu$ L of the recirculated Krebs were taken at different time points and after 3 or 6 h, the mesenteric vascular bed was frozen at the end of the experiment for further analysis.

### 2.4 Extraction of quercetin and metabolites from mesenteric bed and the recirculated buffer

The homogenized mesenteric bed (0.5 mL) was macerated in 0.5 mL methanol/water (60:40, v/v) for 30 min at 25°C in an ultrasonic bath and then centrifuged for 5 min at 3500  $\times$  g. The supernatant was collected and the pellet subjected to additional extraction with 1 mL methanol assisted by sonication (1 min) using a Labsonic 1510 ultrasonic device (Braun, Germany). The suspension was centrifuged and the pellet subjected to the process with methanol further two times. All supernatants were combined and evaporated in a centrifugal concentrator micVac (GeneVac, Ipswich, UK). The residue was dissolved in 250  $\mu$ L acetonitrile/water (30:70 v/v) and centrifuged (5 min, 3500  $\times$  g) previous to its injection (100  $\mu$ L) in HPLC-DAD-ESI/MS. The perfusion fluid was filtered through 0.45- $\mu$ m PVDF (polyvinylidene difluoride membrane) Whatman 4-mm syringe filters (Whatman International, Maidstone, UK) and directly injected (100  $\mu$ L) in HPLC-DAD-ESI/MS.

### 2.5 HPLC-DAD-ESI/MS analyses

Analyses were carried out in a Hewlett-Packard 1100 chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a quaternary pump and a diode array detector (DAD) coupled to an HP Chem Station (rev. A.05.04) data-processing station. An Ascentis<sup>TM</sup> RP-Amide 3  $\mu$ m (2.1  $\times$  150 mm) column was used at a temperature of 30°C. The solvents used were (A) 0.1% formic acid and (B) ACN. An elution gradient was established from 15 to 50% B over 15 min, isocratic 50% B for 10 min, from 50 to 75% B over 3 min, isocratic 75% B for 10 min, and re-equilibration of the column, at a flow rate of 0.2 mL/min. Double online detection was carried out in the DAD using 370 nm as a preferred wavelength and in a mass spectrometer (MS) connected to HPLC system via the DAD cell outlet.

Quantitative analysis of the assayed flavonols and conjugated metabolites was performed from their chromatographic peaks recorded at 370 nm by comparison with calibration curves obtained by injection of increasing concentrations of quercetin and Q3GA. Chromatograms were also recorded at 280 nm in order to detect and quantify protocatechuic acid. MS detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source and a triple quadrupole-ion trap mass analyzer that was controlled by the Analyst 5.1 software. Zero-grade air served as the nebulizer gas (30 psi) and turbo gas for solvent drying (400°C, 40 psi). Nitrogen served as the curtain (20 psi) and collision gas (medium). The quadrupoles were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at  $-4500$  V in the negative mode. Precursor ion analysis was employed to detect all the precursor ions that fragment to a common product ion (i.e.  $m/z$  301 corresponding to quercetin). Settings used were as follows: declustering potential (DP)  $-40$  V, entrance potential (EP)  $-10$  V, collision energy (CE)  $-50$  V, and cell exit potential (CXP)  $-3$  V. Enhanced product ion (EPI) mode was further performed in order to obtain the fragmentation pattern of the parent ion(s) of the studied transition in the previous experiment using the following parameters: DP  $-50$  V, EP  $-6$  V, CE  $-25$  V, and collision energy spread (CES)  $0$  V.

## 2.6 $\beta$ -Glucuronidase activity and protein and mRNA expression

$\beta$ -Glucuronidase activity was measured by a colorimetric analysis using phenolphthalein mono- $\beta$ -glucuronide as the substrate [24]. Briefly, 30  $\mu$ g of protein of vascular mesenteric bed homogenates were mixed with 0.6 mM phenolphthalein mono- $\beta$ -glucuronide in 100  $\mu$ L of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 5. After incubation at 37°C for 30 min followed by adding 200  $\mu$ L of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 11, the absorbance at 540 nm indicating the formation of phenolphthalein aglycone was measured. In some experiments, *D*-saccharolactone (1 mM) was added 1 h before phenolphthalein mono- $\beta$ -glucuronide addition. The protein expression of  $\beta$ -glucuronidase was analyzed by Western blot. Briefly, small mesenteric artery homogenates were run on a SDS-polyacrylamide electrophoresis. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes and incubated with primary polyclonal rabbit anti- $\beta$ -glucuronidase (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight and with the corresponding secondary peroxidase conjugated antibody. Antibody binding was detected with an ECL system (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). For quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analysis, total RNA was extracted from small mesenteric arteries and reverse transcribed to cDNA by standard methods, PCR was performed with a Techne Techgene thermocycler (Techne, Cambridge, UK)

using the primers for  $\beta$ -glucuronidase sense, 5'-CATGAC GAACCAGTCACCAC-3', and antisense, 5'-ACGGTCTGCT TCCCATACAC-3'.

## 2.7 Effects in mesenteric resistance arteries and in the aorta

Endothelium-intact aortic or mesenteric arterial rings (internal diameter 2 and 0.3–0.6 mm, respectively) were mounted in a conventional organ bath or in a wire myograph, respectively, in Krebs solution and stretched to 2 g (aorta) or to give an equivalent transmural pressure of 100 mmHg (mesenteric arteries). In some experiments, the endothelium was removed by intraluminal perfusion of a small mesenteric artery with 0.5% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) for 30 s followed by repeated washing with normal Krebs solution. The presence of functional endothelium was assessed in all preparations by the ability of acetylcholine (1  $\mu$ M) to induce more than 50% relaxation of vessels maximally precontracted with norepinephrine. Vessels were considered to be denuded of functional endothelium when there was no relaxation response to acetylcholine. In the mesenteric arteries, after equilibration, Krebs solution was exchanged with a high-potassium Krebs solution (80 mM) for 15 min. After removing the high potassium solution, concentration–response curves to phenylephrine were constructed by accumulative addition of the drugs. After washing phenylephrine, rings were exposed to quercetin (100  $\mu$ M), quercetin-3-glucuronide (10, 25, 100  $\mu$ M), quercetin-3-glucuronide 100  $\mu$ M, *D*-saccharolactone (300  $\mu$ M, added 1 h before) or vehicle (DMSO) in parallel experiments for 30, 60, 120 or 180 min and then response curves to phenylephrine were repeated. In these experiments, the contractile responses to phenylephrine after incubation with different drugs were expressed as a percentage of maximal response in the first exposure to phenylephrine. In some experiments, the effects of quercetin or Q3GA were assessed in mesenteric arteries incubated with nitro-L-arginine methylester (L-NAME, 100  $\mu$ M) for 20 min. The aorta or the mesenteric arteries were exposed to phenylephrine and exposed to cumulative increases in protocatechuic acid. In some experiments, aortic rings exposed to quercetin were then washed in quercetin-free buffer to analyze the recovery of the effect of quercetin.

## 2.8 Effects on blood pressure

Rats were anaesthetized with 2.5 mL/kg equitensin (500 mL contain 43% w/v chloral hydrate in 81 mL ethanol; 4.86 mg nembutal; 198 mL propylene glycol; 10.63 g MgSO<sub>4</sub>; distilled water) (i.p.) and the carotid artery was cannulated to obtain direct measurements of arterial blood pressure. The catheter was exteriorized through the skin on the dorsal side of the neck and protected with a silver spring. A cannula was also

introduced into the left jugular vein for the administration of quercetin metabolites. Upon completion of the surgical procedure, rats were fasted and allowed to recover for 6 h and, after connecting the catheter to a transducer and a recorder (TRA-021 and Letigraph 2000, respectively; Leticia SA, Barcelona, Spain), blood pressure and heart rate were continuously recorded.

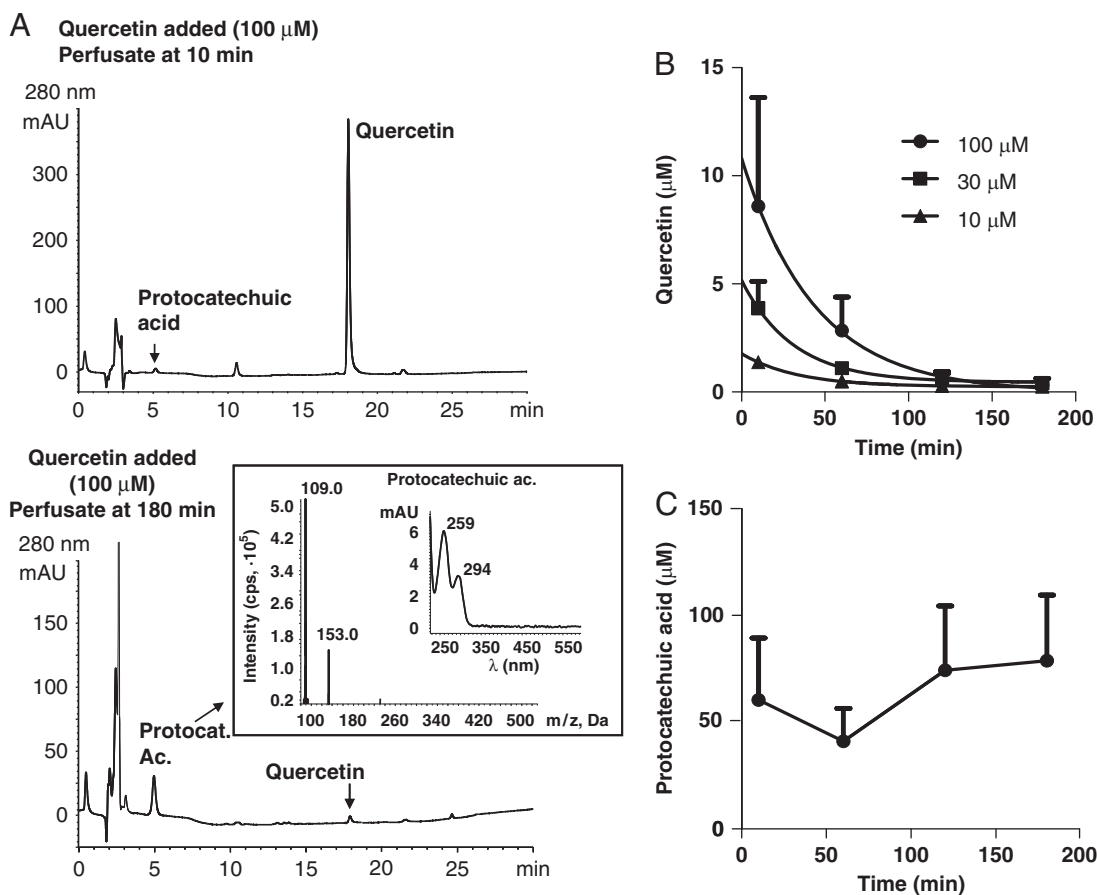
## 2.9 Statistical analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM and  $n$  reflects the number of experiments in tissues from different animals. Statistically significant differences between experimental groups were calculated by Student's  $t$ -test for paired or unpaired observations. For multiple comparisons, a linear univariant analysis (multiple way ANOVA) was carried out and when differences were significant, pairwise comparisons were carried out.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3 Results

### 3.1 Metabolism of quercetin at the perfused mesenteric bed

After 5 min of recirculating a total volume of 7 mL of Krebs buffer (4 mL of reservoir + approximately 3 mL of dead space of tubes and tissue) through the mesenteric bed at 2 mL/min, quercetin was added to the reservoir at the final concentrations of 10, 30 and 100  $\mu$ M. In the first sample, taken at 10 min at the reservoir (time enough for full mixing of the reservoir content with the dead space and tissue), 50–90% of the quercetin added could no longer be detected (Fig. 1). A second slower phase (10–180 min) of decay could be fitted to an exponential decay, indicative of first-order kinetics (Fig. 1B). The rate constants of this process were similar for the three concentrations tested ( $0.37 \pm 0.25 \times 10^3$ ,  $0.40 \pm 0.02 \times 10^3$  and  $0.34 \pm 0.05 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  for 10, 30 and 100  $\mu$ M, respectively). Thus, the half-life of quercetin in this second process was  $32 \pm 3$  min. However, at 180 min, low but clearly detectable concentrations of quercetin



**Figure 1.** Metabolism of quercetin at the perfused mesenteric bed. (A) HPLC chromatograms recorded at 280 nm of samples taken from the recirculated buffer at 10 and 180 min after the addition of quercetin (100  $\mu$ M). The inset shows the mass and UV spectra of protocatechuic acid. (B) Exponential decay of quercetin added at 10, 30 and 100  $\mu$ M in the recirculate. (C) Protocatechuic acid appeared at 10 min in amounts comparable to the added quercetin at sample of the recirculate. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three to six experiments.



( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) could still be detected in the recirculated buffer. Glucuronidated or sulfated metabolites of quercetin were not found in any experiment. Protocatechuic acid was quantitatively the major metabolite, which appeared early (at 10 min) and in concentrations of the same order of those of the added quercetin (Fig. 1C). Incubation of quercetin for periods of up to 3 h with the Krebs solution previously recirculated for 15 min through the mesentery (conditioned Krebs) did not result in any metabolite, ruling out that metabolism could occur via enzymes released from the mesentery as has been shown with some proteases [22]. Despite the low levels of quercetin in the recirculated buffer, after 180 or 360 min quercetin could be detected in the homogenates of the mesentery in a concentration-dependent manner (Fig. 2). In most experiments, methylquercetin (3'- or 4'-) was also present in these homogenates, while protocatechuic acid was not found (Fig. 2).

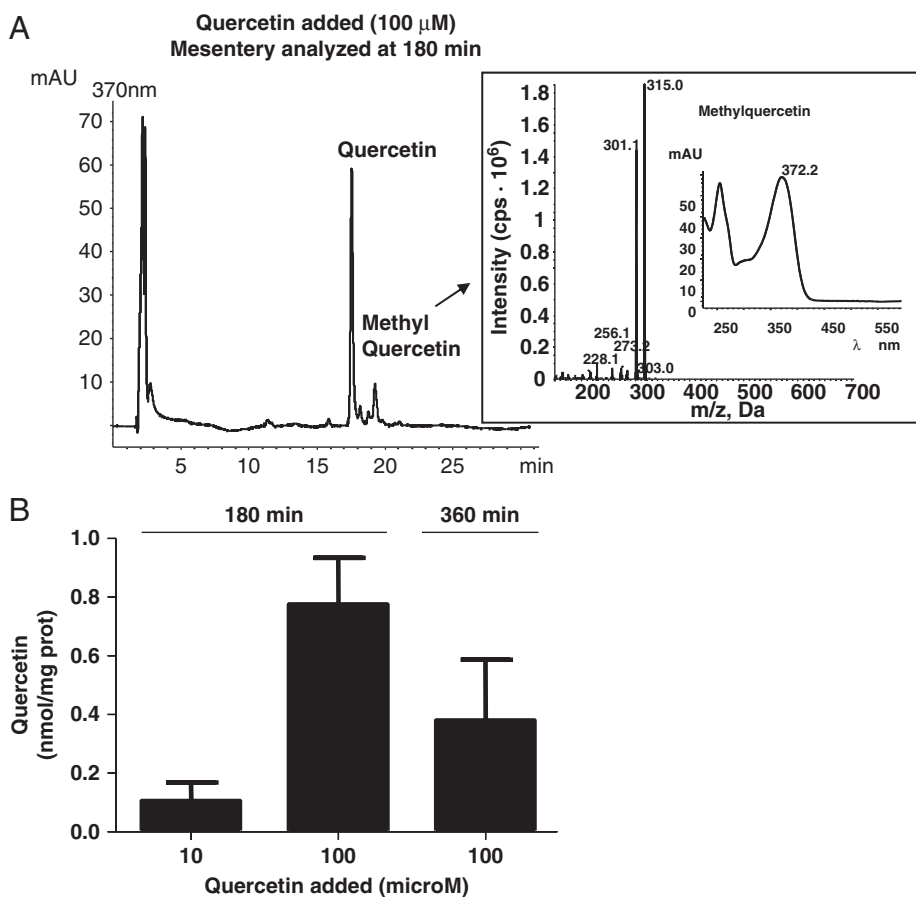
### 3.2 Metabolism of quercetin-3-glucuronide at the perfused mesenteric bed

At 10 min after the addition of Q3GA,  $\sim 60\%$  of Q3GA (e.g.  $\sim 60 \mu\text{M}$  from  $100 \mu\text{M}$  added) remained in the recirculated buffer; the missing 40% probably reflects uptake by the tissue. However, Q3GA was relatively stable in the recirculated buffer

(Fig. 3) with a half-life ( $\sim 225$  min) much more prolonged than that of quercetin. This decay was accompanied by a progressive increase in quercetin in the recirculated buffer. Despite quercetin being present in significant concentrations in the recirculated buffer, protocatechuic acid was not found in these experiments. To corroborate quercetin deconjugation, experiments were performed with Q3GA in the presence of the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor saccharolactone. Accordingly, this drug fully prevented the decay in Q3GA and the increase in quercetin (Fig. 3C). The analysis of the homogenates of the mesentery recirculated with Q3GA (Fig. 4) showed that after 180 min, the concentration of Q3GA was low but a significant peak of quercetin together with a minor peak of methylquercetin could be detected. At 360 min, a further decrease in Q3GA and the corresponding increase in free quercetin were observed. As expected, in the presence of saccharolactone a larger amount of Q3GA was preserved in the mesentery and consequently a decreased level of free quercetin was found.

### 3.3 $\beta$ -Glucuronidase activity and expression

As shown in Fig. 4E,  $\beta$ -glucuronidase activity sensitive to saccharolactone was detected in homogenates of the mesenteric bed. Moreover, the expression of the protein was



**Figure 2.** Metabolism of quercetin at the perfused mesenteric bed. (A) HPLC chromatograms recorded at 370 nm of the mesenteric homogenates after 180 min of recirculation with quercetin ( $100 \mu\text{M}$ ). The inset shows the mass and UV spectra of methylquercetin. (B) Concentration of quercetin in the homogenates of the mesentery after 180 or 360 min of the addition of 10 or  $100 \mu\text{M}$  quercetin. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three experiments.

also observed in Western blots (Fig. 4E) and mRNA expression was confirmed by quantitative PCR (not shown).

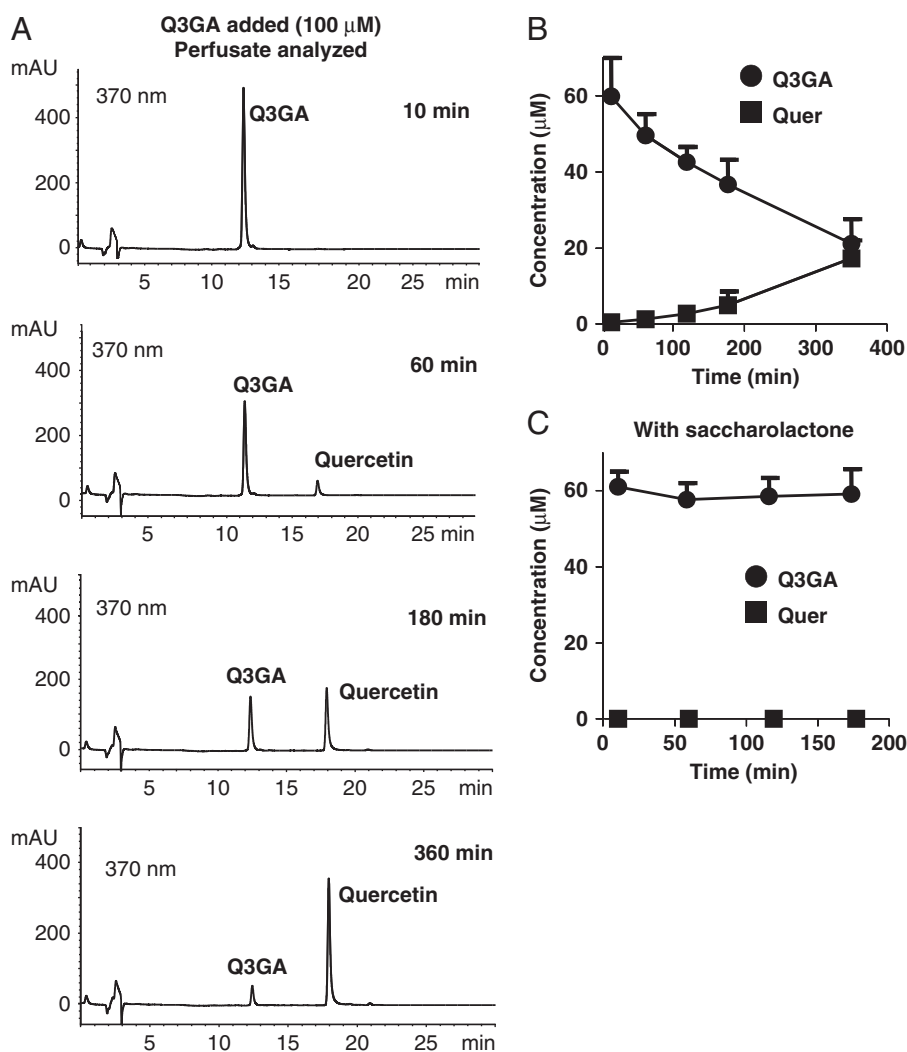
### 3.4 Effects on vascular contraction

In the mesenteric arteries incubated for 30 min with Q3GA (100  $\mu$ M), there was no significant effect on the contractile response induced by phenylephrine while quercetin induced a strong inhibitory effect (Fig. 5A). However, a longer incubation period of 180 resulted in a significant inhibitory effect of Q3GA (Fig. 5B), which was completely inhibited in the presence of saccharolactone (Fig. 5C). The presence of the NO (nitric oxide) synthase inhibitor L-NAME or the removal of endothelium had no major effect on the inhibitory effects of Q3GA (Fig. 5D–F). Figure 6 shows the time course of the effects of lower concentrations of Q3GA (10 and 25  $\mu$ M), closer to physiological values. The inhibitory effect of Q3GA was significant at 60 min and at 120 min for 25 and 10  $\mu$ M, respectively. Protocatechuic acid

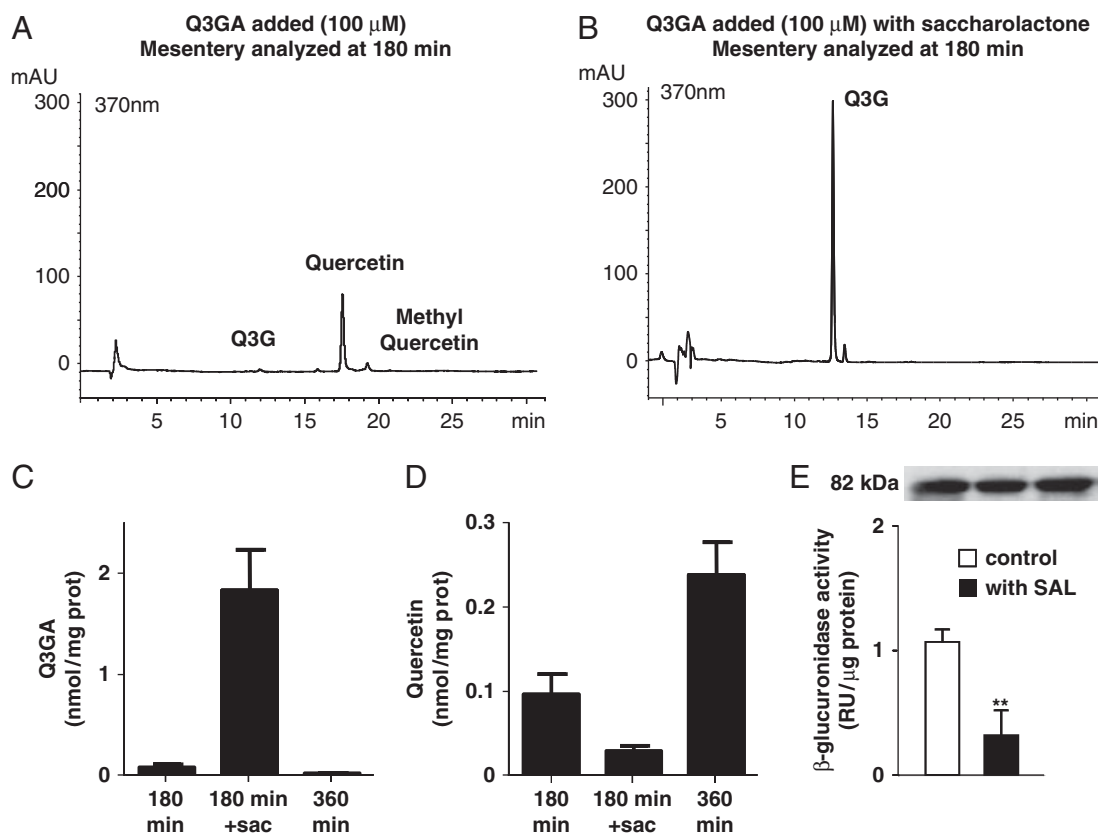
(1  $\mu$ M to 1 mM) had no relaxant effect in the aorta or mesenteric arteries (not shown). Figure 7 shows that the vasorelaxant effect of quercetin in a rat aorta was reversible upon washing with flavonoid-free solution. The relaxant effect of quercetin was unaffected by saccharolactone (not shown).

### 3.5 In vivo effects

Conscious rats had a mean arterial blood pressure of  $123 \pm 6$  mm Hg. We administered an intravenous dose of 1 mg/kg Q3GA, which is expected to result in an immediate plasma concentration of  $\sim 25$   $\mu$ M, assuming 20 mL of plasma in 250 g of rat, which should then decay due to distribution, excretion and metabolism. This concentration is comparable with those achieved at 1 h after the oral doses of 10–50 mg/kg [25]. Q3GA induced a progressive and long-lasting decrease in blood pressure, which was significant at  $\geq 60$  min and reached a plateau at  $> 100$  min while the



**Figure 3.** Metabolism of Q3GA at the perfused mesenteric bed. (A) HPLC chromatograms recorded at 370 nm of samples taken from the recirculated buffer at 10, 60, 180 and 360 min after the addition of Q3GA (100  $\mu$ M). (B) Decay of Q3GA was accompanied by a progressive increase of quercetin in the perfusate. (C) The decay of Q3GA and the increase of quercetin in the perfusate was prevented by the presence of the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor saccharolactone (300  $\mu$ M). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three experiments.



**Figure 4.** Metabolism of Q3GA at the perfused mesenteric bed. HPLC chromatograms recorded at 370 nm of the mesenteric homogenates after 180 min of recirculation with Q3GA (100  $\mu$ M) in the absence (A) or presence (B) of saccharolactone (300  $\mu$ M). Concentration of Q3GA (C) and quercetin (D) in the homogenates of the mesentery after 180 or 360 min. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three experiments. Panel (E) shows the bands of  $\beta$ -glucuronidase expression by Western blot in mesenteric bed homogenates (upper panel) and  $\beta$ -glucuronidase activity and its inhibition by saccharolactone (lower panel, mean  $\pm$  SEM of eight experiments).

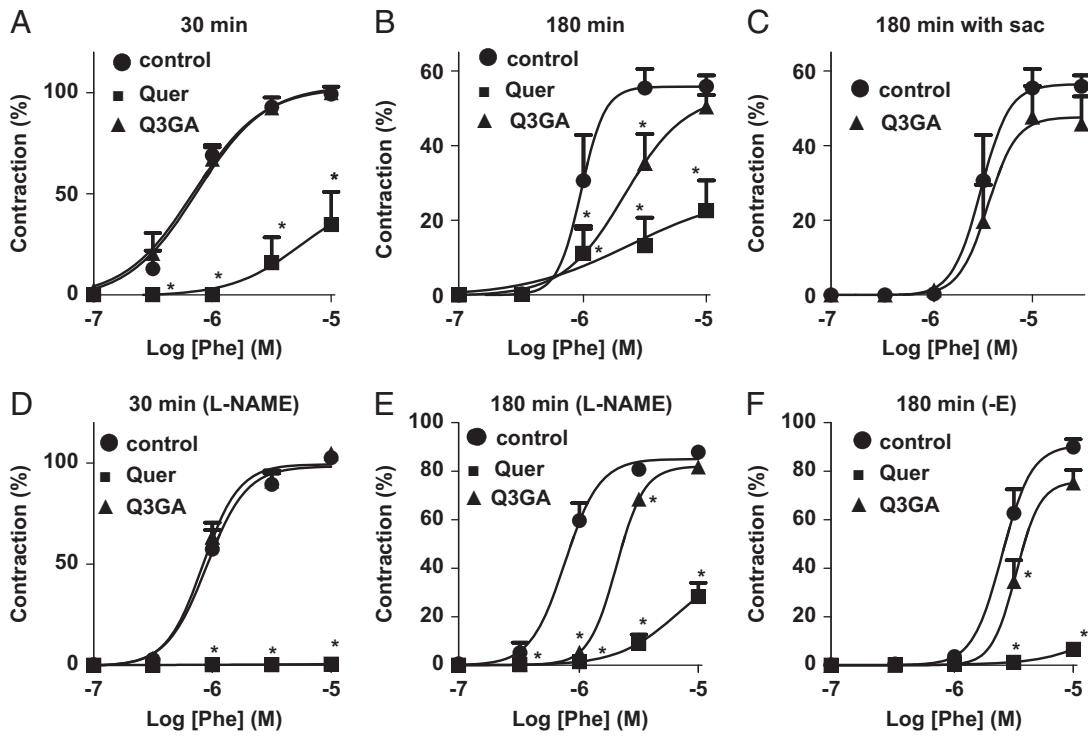
vehicle (saline) had no effect (Fig. 8A). Q3GA had no effect on heart rate compared with vehicle.

#### 4 Discussion

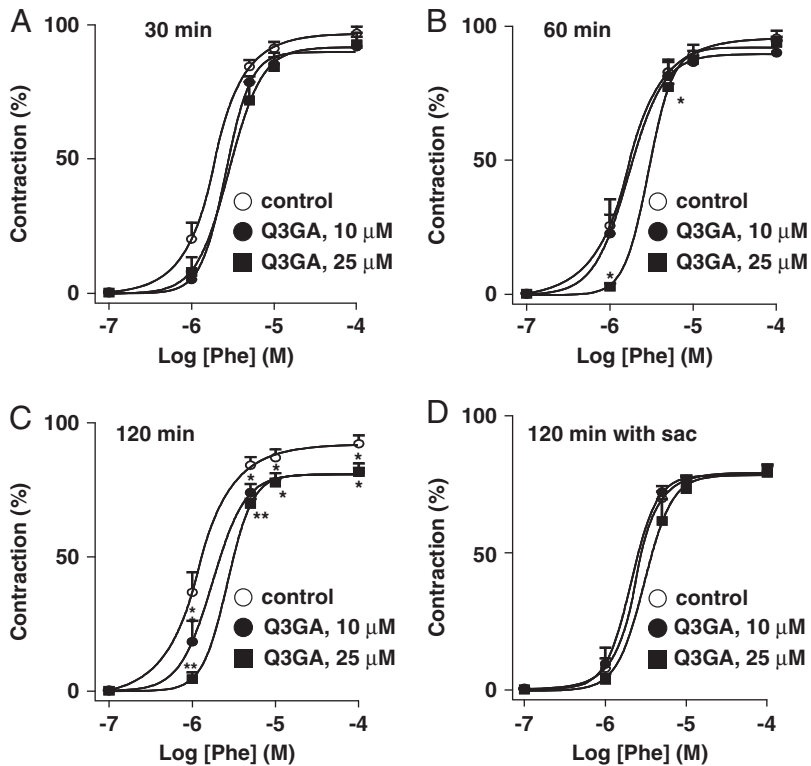
The validity of a large number of studies analyzing the *in vitro* effects of quercetin and other flavonoids that are not present as free forms in plasma has been put into question. Some previous studies have shown that quercetin glucuronides can be deconjugated *in vitro* in cultured macrophages [24] and in homogenates from human liver and small intestine [26]. Despite quercetin being undetectable as a free form in the plasma of supplemented pigs, it can be found in relatively high concentrations in several tissues [27]. Herein, we have demonstrated that (i) Q3GA can be deconjugated enzymatically in a perfused vascular bed releasing free quercetin, which accumulates in the perfusing fluid and within the tissue; (ii) Q3GA is more stable than free quercetin in the vascular bed; (iii) Q3GA exerts inhibitory effects on vascular contraction *in vitro* when incubated for long time periods via the release of free

quercetin; and (iv) quercetin-3-glucuronide exerts a progressive and long-lasting blood pressure lowering effect *in vivo*. Taken together, these results suggest that the circulating glucuronides in plasma behave as quercetin carriers and that the aglycone released in the target organs seems to be the final effector.

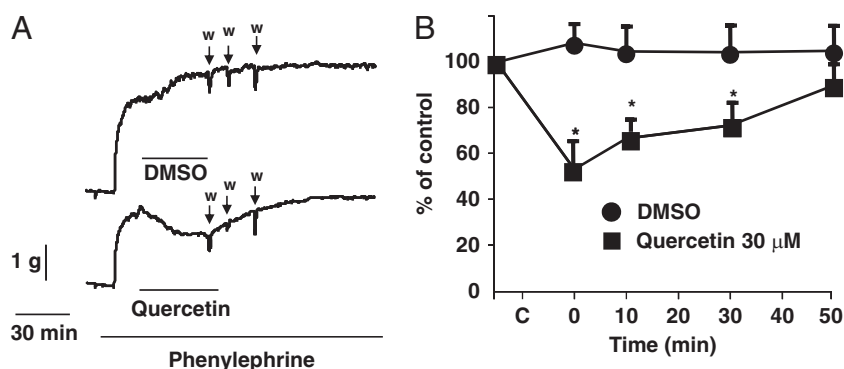
We first analyzed the metabolism of quercetin in the isolated perfused vascular bed. Quercetin disappeared rapidly from the recirculating buffer; within the time required for full mixing in the circuit more than half quercetin was lost from the fluid. Part of this can be attributed to the uptake by the tissue. However, the simultaneous appearance of protocatechuic acid indicates that metabolism accounts for most of the quercetin concentration decay. This elimination appears to be due to tissue-mediated oxidative degradation involving peroxidation and subsequent opening of the C-ring leading to the formation of the carboxylic acid [28]. Protocatechuic acid due to its high polarity remained in the recirculating buffer and it was not detected in the tissue. Despite the rapid decay in the buffer, quercetin was present in the tissue after long-term incubation, suggesting that it accumulates in a compartment in



**Figure 5.** Inhibitory effects of Q3GA and quercetin (100  $\mu$ M) on the contractile responses to phenylephrine in isolated endothelium-intact (A–E) or endothelium-denuded (F) mesenteric resistance arteries after 30 min (A, D) or 180 min (B, C, E, F) in the absence (A, B) or in the presence of 300  $\mu$ M saccharolactone (C), L-NAME (D, E). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 4–8 experiments. \* $p < 0.05$  versus control.



**Figure 6.** Inhibitory effects of Q3GA (10 or 25  $\mu$ M) on the contractile responses to phenylephrine in isolated mesenteric resistance arteries after 30, 60 and 120 min (A) or after 120 min in the presence of saccharolactone (B). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 4–8 experiments. \* $p < 0.05$  versus control.

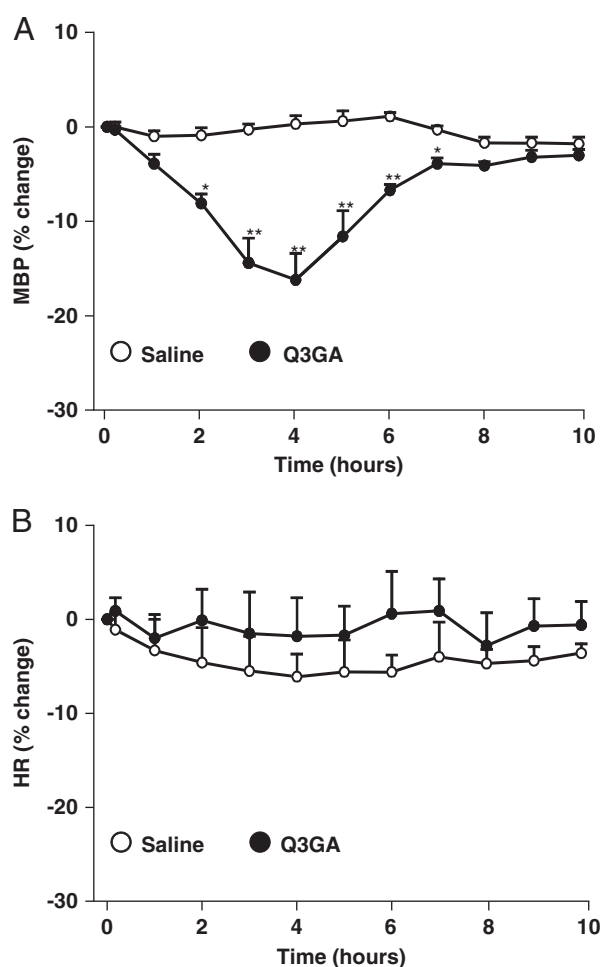


**Figure 7.** Reversal of the vasodilator effects of quercetin in isolated rat aorta upon removal of the flavonoid. The aorta precontracted by phenylephrine (100 nM) was exposed to quercetin or its vehicle DMSO for 45 min and then washed three times as indicated by the arrows. Panel A shows a typical experiment and panel B the averaged values of vascular tone expressed as a percent of the initial values before addition of quercetin or vehicle. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of four experiments, \* $p$  < 0.05 versus control.

which it is partly protected from degradation. Quercetin was accompanied by smaller amounts of methylquercetin but there was no evidence of glucuronidated metabolites.

Q3GA was more stable in the recirculating buffer than quercetin. The slow decay of Q3GA was accompanied by a parallel increase in quercetin, suggesting that deconjugation is the primary metabolic pathway for Q3GA. This was supported by the strong inhibitory effect of the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor on Q3GA metabolism. In contrast to this in vitro model in which free quercetin slowly accumulates in the recirculating fluid, free quercetin in plasma is almost absent in in vivo experiments, presumably because it is rapidly re-glucuronidated in the liver [12, 13]. In addition, quercetin accumulated in the tissue and this was prevented by the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor. Moreover, the concentrations of quercetin aglycone in the tissue continued to increase from 3 to 6 h after the addition of Q3GA while they decreased during this time interval when the aglycone was added. An interesting and intriguing finding of the present study is the fact that quercetin derived from the deconjugation of Q3GA was not further metabolized into proto-catechuic acid. All this data support that circulating Q3GA acts as a stable store of quercetin, which slowly releases free quercetin avoiding its rapid degradation.

The vasorelaxant effects of quercetin and related metabolites have been widely assessed in vitro [6, 7]. Our previous results also showed that quercetin conjugated metabolites (Q3GA, quercetin-3'-O-sulfate or isorhamnetin-3-O-glucuronide) have no direct vasorelaxant effect in isolated rat aorta [18] or in mesenteric arteries (unpublished) in either endothelium-intact or denuded arterial rings. In the present study, Q3GA when incubated for 30 min was also without effect. However, long-term incubation induced a progressive inhibitory effect on vascular contraction in a concentration- and time-dependent manner and these effects were independent of endothelium and nitric oxide. These results suggest that deconjugation is required for the biological effect. In fact, the  $\beta$ -glucuronidase inhibitor prevented the effect of Q3GA. Thus, we provide the first evidence correlating vascular deconjugation with biological activity. An important issue in order to correlate the concentrations of quercetin with its biological effect is whether the vasodilator



**Figure 8.** Effects of intravenous Q3GA (1 mg/kg) on arterial blood pressure (A) and heart rate (B) measured by direct carotid artery recording in a conscious rat. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of four experiments; \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 versus saline.

effects of quercetin are reversible or not. Despite a large number of studies having shown the in vitro vasodilator effect of quercetin, to our knowledge none of them have addressed its reversibility after the washout. Herein, we

show that when quercetin is removed, the contractile effect is almost fully recovered within 60 min.

We also addressed the *in vivo* vasodilator effects of Q3GA. The glucuronide administered intravenously, as it is found after oral administration of quercetin, induced a decrease in arterial blood pressure. To our knowledge, this is the first demonstration that Q3GA exerts effects *in vivo*. The slow onset and progressive blood pressure lowering effect is in agreement with the *in vitro* data and it is also consistent with the view that metabolism is required. Recently, an interesting hypothesis has been raised proposing that polyphenols are metabolized by the resident microbiota in the colon and the metabolites entering the systemic circulation may be responsible for the *in vivo* effects [29]. Our data show, however, that the effect of the flavonoid quercetin when given orally can be explained, at least in part, by the glucuronidated metabolite produced within the intestine and liver. Both mechanisms are not mutually exclusive and may, therefore, contribute to the biological effects associated to the intake of dietary flavonoids.

In conclusion, Q3GA can be deconjugated in the vascular bed, it can exert inhibitory effects on vascular contraction in the long term due to the release of the active aglycone and it also induces a long-lasting blood pressure lowering effect. We propose that quercetin, and possibly other related flavonoids, given orally is rapidly metabolized in the intestine and liver into glucuronidated derivatives which act as carriers of quercetin and deliver the free aglycone *in situ* by deconjugation.

*This work was supported by Grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-66108, SAF2008-03948, AGL2009-12001 and SAF2010-22066) and Consolider-Ingenio 2010 Programme (CSD2007-00063), Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P06-CTS-01555), and Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (Red HERACLES RD06/0009). L.M. is a recipient of a Juan de la Cierva and Marie Curie reintegration grants. C.M. is funded by a predoctoral Formación del Personal Investigador grant.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993, *342*, 1007–1011.
- [2] Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P. C., de Vries, J. H., Katan, M. B., Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J. Am. Diet Assoc.* 2002, *102*, 1414–1420.
- [3] Keli, S. O., Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D., Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch. Intern. Med.* 1996, *156*, 637–642.
- [4] Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* 2010, *31*, 478–494.
- [5] Cogolludo, A., Frazziano, G., Briones, A. M., Cobeno, L. et al., The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation. *Cardiovasc. Res.* 2007, *73*, 424–431.
- [6] Duarte, J., Perez Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J. et al., Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 1993, *24*, 857–862.
- [7] Perez-Vizcaino, F., Ibarra, M., Cogolludo, A. L., Duarte, J. et al., Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, *302*, 66–72.
- [8] Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J., Swies, J., On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 1987, *36*, 317–322.
- [9] Menendez, C., Jimenez, R., Moreno, L., Galindo, P. et al., Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle. *Br. J. Nutr.* 2011, *105*, 1287–1293.
- [10] Duarte, J., Perez-Palencia, R., Vargas, F., Ocete, M. A. et al., Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 2001, *133*, 117–124.
- [11] Scalbert, A., Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 2000, *130*, 2073S–2085S.
- [12] Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G. et al., Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic. Res.* 2001, *35*, 941–952.
- [13] Kawai, Y., Saito, S., Nishikawa, T., Ishisaka, A. et al., Different profiles of quercetin metabolites in rat plasma: comparison of two administration methods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, *73*, 517–523.
- [14] Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000, *52*, 673–751.
- [15] Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J. et al., How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, *80*, 15–21.
- [16] Kay, C. D., The future of flavonoid research. *Br. J. Nutr.* 2010, *104*, S91–S95.
- [17] Lodi, F., Jimenez, R., Menendez, C., Needs, P. W. et al., Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta Med.* 2008, *74*, 741–746.
- [18] Lodi, F., Jimenez, R., Moreno, L., Kroon, P. A. et al., Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* 2009, *204*, 34–39.
- [19] Wright, B., Moraes, L. A., Kemp, C. F., Mullen, W. et al., A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated

- platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 159, 1312–1325.
- [20] Winterbone, M. S., Tribolo, S., Needs, P. W., Kroon, P. A., Hughes, D. A., Physiologically relevant metabolites of quercetin have no effect on adhesion molecule or chemokine expression in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2009, 202, 431–438.
- [21] Duenas, M., Mingo-Chornet, H., Joaquin Perez-Alonso, J., Di Paola-Naranjo, R. et al., Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 1060–1076.
- [22] Perez-Vizcaino, F., Cooper, A. C., Corder, R., Fournier, A., Warner, T. D., Rapid degradation of endothelin-1 by an enzyme released by the rat isolated perfused mesentery. *Br. J. Pharmacol.* 1995, 114, 867–871.
- [23] Kushinsky, S., Chen, V. L., The inhibition of beta-glucuronidase from bovine liver by 1,4-saccharolactone. *Comp. Biochem. Physiol.* 1967, 20, 535–542.
- [24] Kawai, Y., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S. et al., Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 9424–9434.
- [25] da Silva, E. L., Piskula, M. K., Yamamoto, N., Moon, J. H., Terao, J., Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett.* 1998, 430, 405–408.
- [26] O’Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Sly, W. S. et al., Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett.* 2001, 503, 103–106.
- [27] Bieger, J., Cermak, R., Blank, R., de Boer, V. C. et al., Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J. Nutr.* 2008, 138, 1417–1420.
- [28] Boulton, D. W., Walle, U. K., Walle, T., Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51, 353–359.
- [29] van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., Jacobs, D. M., Kemperman, R. A. et al., Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 4531–4538.

## **ARTÍCULO 3**

# **Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation**

*Pilar Galindo*, Isabel Rodríguez-Gómez, Susana González-Manzano, Montserrat Dueñas, Rosario Jimenez, Carmen Menéndez, Félix Vargas, Juan Tamargo, Celestino Santos-Buelga, Francisco Perez-Vizcaino and Juan Duarte.

Plos One (2012)

7(3): e32673





# Glucuronidated Quercetin Lowers Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats via Deconjugation

Pilar Galindo<sup>1</sup>, Isabel Rodríguez-Gómez<sup>2</sup>, Susana González-Manzano<sup>3</sup>, Montserrat Dueñas<sup>3</sup>, Rosario Jiménez<sup>1</sup>, Carmen Menéndez<sup>4,5</sup>, Félix Vargas<sup>2</sup>, Juan Tamargo<sup>4</sup>, Celestino Santos-Buelga<sup>3</sup>, Francisco Pérez-Vizcaino<sup>4,5</sup>, Juan Duarte<sup>1\*</sup>

**1** Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain, **2** Department of Physiology, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain, **3** Grupo de Investigación en Polifenoles, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **4** Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, **5** Ciber Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain

## Abstract

**Background:** Chronic oral quercetin reduces blood pressure and restores endothelial dysfunction in hypertensive animals. However, quercetin (aglycone) is usually not present in plasma, because it is rapidly metabolized into conjugated, mostly inactive, metabolites. The aim of the study is to analyze whether deconjugation of these metabolites is involved in the blood pressure lowering effect of quercetin.

**Methodology/Principal Findings:** We have analyzed the effects on blood pressure and vascular function *in vitro* of the conjugated metabolites of quercetin (quercetin-3-glucuronide, Q3GA; isorhamnetin-3-glucuronide, I3GA; and quercetin-3'-sulfate, Q3'S) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Q3GA and I3GA (1 mg/kg i.v.), but not Q3'S, progressively reduced mean blood pressure (MBP), measured in conscious SHR. The hypotensive effect of Q3GA was abolished in SHR treated with the specific inhibitor of  $\beta$ -glucuronidase, saccharic acid 1,4-lactone (SAL, 10 mg/ml). In mesenteric arteries, unlike quercetin, Q3GA had no inhibitory effect in the contractile response to phenylephrine after 30 min of incubation. However, after 1 hour of incubation Q3GA strongly reduced this contractile response and this effect was prevented by SAL. Oral administration of quercetin (10 mg/Kg) induced a progressive decrease in MBP, which was also suppressed by SAL.

**Conclusions:** Conjugated metabolites are involved in the *in vivo* antihypertensive effect of quercetin, acting as molecules for the plasmatic transport of quercetin to the target tissues. Quercetin released from its glucuronidated metabolites could be responsible for its vasorelaxant and hypotensive effect.

**Citation:** Galindo P, Rodríguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, et al. (2012) Glucuronidated Quercetin Lowers Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats via Deconjugation. PLoS ONE 7(3): e32673. doi:10.1371/journal.pone.0032673

**Editor:** Joao B. Calixto, Universidad Federal de Santa Catarina, Brazil

**Received:** November 28, 2011; **Accepted:** February 2, 2012; **Published:** March 12, 2012

**Copyright:** © 2012 Galindo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-66108, SAF2008-03948, AGL2009-12001 and SAF2010-22066) and Consolider-Ingenio 2010 Programme (CSD2007-00063), Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P06-CTS-01555), and Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (Red HERACLES RD06/0009 and Red de Investigación Renal, REDinREN RD06/0016/0017). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: jmduarte@ugr.es

## Introduction

Flavonoids are polyphenolic compounds that occur ubiquitously in plants and are consumed in the form of fruits, vegetables, nuts and derived products such as wine and chocolate. The average daily intake in the western diet of flavonols plus flavones (two main classes of flavonoids) is estimated to be  $\approx 23$  mg, with quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) contributing 60–75% of the total [1,2]. Quercetin is a prime example of such a flavonoid group and it is found in foods bound to sugars, mainly as  $\beta$ -glycosides. Quercetin glycosides occur in broccoli, apples, and especially in onions, with an abundance as high as 0.25–0.5 g/kg [3]. Prospective studies have shown an inverse correlation between dietary flavonoid intake and mortality from coronary heart disease [1,4]. Several studies using various animal models provide support for the observed protective effects of dietary flavonoids with respect to cardiovascular diseases [5]. For example, quercetin

exerts systemic and coronary vasodilatation and antiaggregant effects *in vitro* [6–8] and reduces blood pressure, oxidative status and end-organ damage in animal models of hypertension [9,10], including spontaneously hypertensive rats (SHR) [9–12]. Chronic quercetin also reduces blood pressure in stage 1 hypertensive subjects [13]. However, there are not studies analyzing the acute effects on blood pressure of oral quercetin.

Many previous *in vitro* studies have exposed tissues or cultured cells to commercially available aglycones or the glycosylated compounds which are present at extremely low concentrations in plasma [14]. Upon ingestion with the diet, quercetin glycosides are rapidly hydrolyzed during their passage across the small intestine or by bacterial activity in the colon to generate quercetin aglycone. Absorbed quercetin is rapidly conjugated with glucuronic acid and/or sulfate during first-pass metabolism (intestine-liver) and a portion of the metabolites are also methylated and, therefore, the major metabolites of quercetin in rat and human plasma are

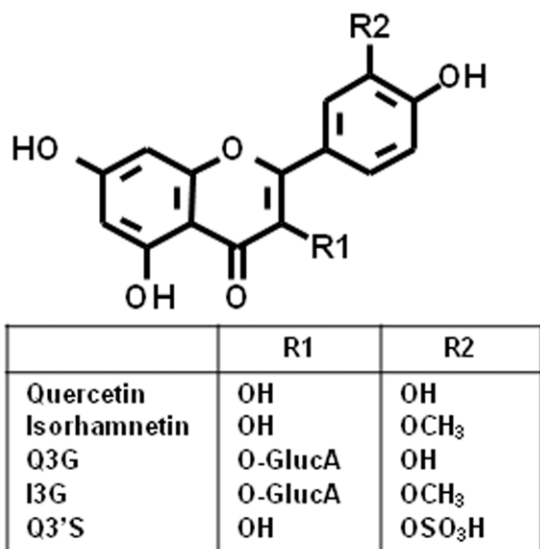
quercetin-3-glucuronide (Q3GA), quercetin-3'-sulfate (Q3'S) and isorhamnetin-3-glucuronide (I3GA) (Figure 1) while the aglycone is usually undetectable [15–18]. The biological activity of quercetin is generally attenuated after its conversion into the metabolites. However, antioxidant activity for various quercetin metabolites has been reported [19–21]. This may lead in vascular beds to an improvement of endothelial function, while the conjugated metabolites have no direct vasorelaxant effect in rat aorta [21]. Moreover, injured/inflamed arteries, as occur in hypertension and atherosclerosis, with activated macrophages are potential targets of the metabolites of dietary quercetin [22]. Some previous studies have shown that quercetin glucuronides can be deconjugated *in vitro* in cultured macrophages [22] and in homogenates from human liver and small intestine [23]. Q3GA can be also slowly deconjugated within the vascular wall [24].

We hypothesized that the antihypertensive effects of quercetin could be mediated by the conjugated derivatives that are present in the circulating blood. These metabolites would reduce vascular tone after deconjugation in the vascular tissue. Therefore, the aim of the present study was to analyse the long term *in vitro* effects of the main plasma quercetin conjugates in resistance mesenteric arteries, their *in vivo* effects given intravenously on blood pressure in SHR and the role of deconjugation via glucuronidase. Moreover, we tested whether deconjugation is required for the antihypertensive effects of oral quercetin aglycone.

## Materials and Methods

### Animals

All the experiments were performed in accordance with Institutional Guidelines for the ethical care of animals, and ethic committee of the University of Granada approved this study (ref. 2066/10). Twenty four-week old, male spontaneously hypertensive rats (SHR) were obtained from Harlan Laboratories (Barcelona, Spain). All rats were maintained five per cage at a constant temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), with a 12-hour dark/light cycle and on standard rat chow.



**Figure 1. Structure of quercetin and its metabolites isorhamnetin, quercetin 3-glucuronide (Q3GA), isorhamnetin 3-glucuronide (I3GA) and quercetin 3'-sulfate (Q3'S).**

doi:10.1371/journal.pone.0032673.g001

### Blood pressure measurement

Direct blood pressure was measured in conscious SHR. For this purpose, the rats were anaesthetised with 2.5 mL/kg i.p. equitensin (500 mL contain 43% w/v chloral hydrate in 81 mL ethanol; 4.86 mg pentobarbitone; 198 mL propylene glycol; 10.63 g MgSO<sub>4</sub>; distilled water) and the carotid artery was cannulated to obtain direct measurements of arterial blood pressure. The catheter was exteriorised through the skin on the dorsal side of the neck and protected with a silver spring. A cannula was also introduced into the left jugular vein for the administration of quercetin metabolites and blood sampling. Upon completion of the surgical procedure, rats were fasted and allowed to recover for 6 h and, after connecting the catheter to a transducer and a two-channel recorder (TRA-021 and Letigraph 2000, respectively; Letica SA, Barcelona, Spain), blood pressure and heart rate (HR) were continuously recorded. Animals received either Q3GA (0.2, 0.02 or 1 mg/kg), Q3'S or I3GA (1 mg/kg), or drug vehicle (100  $\mu\text{L}$  of phosphate buffered saline). The acute effect of an oral dose of quercetin (10 mg/kg) administered by gavage on blood pressure and heart rate were also analysed.

In another set of experiments, SHR rats were daily given i.p. for 3 days either isotonic solution (1 mL) or D-saccharic acid 1.4-lactone (SAL), a specific inhibitor of beta-glucuronidase, (10 mg/mL in 1 mL) [25] before the administration of the flavonoids.

### Analysis of quercetin metabolites in rat plasma

Blood was collected into heparinized tubes and centrifuged. The plasma samples (300  $\mu\text{L}$ ) were extracted with 300  $\mu\text{L}$  of methanol/0.5 M acetic acid (80:20, v/v) for 30 min at  $25^\circ\text{C}$  in an ultrasonic bath, and then centrifuged for 3 min at 3500 g. The supernatant was collected and the pellet was submitted to the same process two further times assisted by sonication (1 min) using a Microson<sup>TM</sup> ultrasonic cell disruptor (New York, USA). The methanolic extracts were combined and dried in a centrifugal concentrator micVac (GeneVac, Ipswich, United Kingdom). The residue was dissolved in 120  $\mu\text{L}$  acetonitrile/water (30:70 v/v) and centrifuged (5 min, 3500 g) previous to its injection (100  $\mu\text{L}$ ) in the HPLC-DAD-ESI/MS system.

Analyses were carried out in a Hewlett-Packard 1100 chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a quaternary pump and a DAD coupled to an HP Chem Station (rev. A.05.04) data-processing station. An Ascentis<sup>TM</sup> RP-Amide 3  $\mu\text{m}$  (2.1  $\times$  150 mm) column at  $30^\circ\text{C}$  was used. The solvents used were: (A) 0.1% formic acid, and (B) acetonitrile. An elution gradient was established from 15 to 50% B over 15 min, isocratic 50% B for 10 min, from 50 to 75% B over 3 min, isocratic 75% B for 10 min, and re-equilibration of the column, at a flow rate of 0.2 mL/min. Double online detection was carried out in the DAD using 370 nm as a preferred wavelength and in a mass spectrometer connected to HPLC system via the DAD cell outlet. MS detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source and a triple quadrupole-ion trap mass analyzer that was controlled by the Analyst 5.1 software. Zero grade air served as the nebulizer gas (30 psi) and turbo gas for solvent drying ( $400^\circ\text{C}$ , 40 psi). Nitrogen served as the curtain (20 psi) and collision gas (medium). The quadrupoles were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at  $-4500\text{ V}$  in the negative mode. Precursor ion analysis was employed to detect all the precursor ions that fragment to a common product ion (i.e.,  $m/z$  301 corresponding to quercetin). Settings used were: declustering potential (DP)  $-40\text{ V}$ , entrance potential (EP)  $-10\text{ V}$ , collision energy (CE)  $-50\text{ V}$ , and cell exit potential  $-3\text{ V}$ . Enhanced product ion mode was further performed in order to obtain the fragmentation

pattern of the parent ion(s) of the studied transition in the previous experiment using the following parameters: DP –50 V, EP –6 V, CE –25 V, and collision energy spread 0 V. Quantitative analysis of the assayed flavonols and conjugated metabolites was performed from their chromatographic peaks recorded at 370 nm by comparison with calibration curves obtained by injection of increasing concentrations of quercetin, I3GA, and Q3GA.

### Vascular reactivity *in vitro*

SHR were stunned and killed by cervical dislocation. The mesentery was removed and placed in cold Krebs solution (composition in mmol/L: NaCl 118, KCl 4.75, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, and glucose 11). Third-order arteries were cleaned of surrounding fat and mounted in an automated tension myograph (Danish Myotechnology, Denmark) containing Krebs solution maintained at 37°C and gassed with 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>. After an equilibration period of 45 min, vessels were normalized according to published protocols and vessel diameter determined [26]. Following normalization, relaxation of phenylephrine (3 μM)-precontracted vessels to acetylcholine (ACh, 1 μM) was used to determine endothelial integrity (vessels that relaxed by at least 50% were considered endothelium-intact).

In order to analyze the effects on vascular function, in endothelium-intact rings a concentration–response curve was constructed by cumulative addition of phenylephrine (10<sup>–7</sup>–10<sup>–4</sup> M). Then vessels incubated in the absence or presence of quercetin, isorhamnetin, Q3'S, Q3GA or I3GA (10 or 25 μM) for 30–120 min and a second concentration–response curve was performed. In some arteries SAL (1 mM) was added 1 hour before and during the incubation period with Q3GA.

### β-glucuronidase activity

β-glucuronidase activity was measured by a colorimetric analysis using phenolphthalein mono-β-glucuronide as the substrate [22]. Briefly, 30 μg of protein of vascular mesenteric bed homogenates from SHR were mixed with 0.6 mM phenolphthalein mono-β-glucuronide in 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 5. After incubation at 37°C for 30 min followed by adding 200 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 11, the absorbance at 540 nm indicating the formation of phenolphthalein aglycone was measured. In some experiments, SAL (1 mM) was added 1 hour before phenolphthalein mono-β-glucuronide addition.

### Materials

Q3GA was isolated from green bean pods and stored as described [27]. Briefly, defatted pods were homogenized in 70% MeOH, the concentrated extract was fractionated on a polyamide column and washed firstly with phosphate buffer, then with methanol and finally with methanol/ammonia (99.5:0.5 v/v) to elute the acidic flavonols (e.g. glucuronides). The glucuronide was purified by semipreparative-HPLC. Q3'S was synthesized by an adaptation of the method described by Jones et al. [28]. Briefly, dehydrated quercetin was dissolved in dioxane and allowed to react at 40°C for 90 min with a 10-fold molar excess of sulfur trioxide-N-triethylamine complex under a nitrogen atmosphere. Precipitated products of sulfation were redissolved in 10% methanol in water and the mixtures of quercetin sulfates were fractionated on a Sephadex LH-20 column and Q3'S further purified by semipreparative HPLC. I3GA was produced enzymatically using pig liver microsomal enzymes with a modification of the methodology described by Plumb et al. [29]. Briefly, a post-lysosomal fraction was obtained from a pig liver extract, incubated with isorhamnetin at 37°C for 240 min, in a Hepes buffer

(25 mM, pH 5.5 and pH 7.2) or ultra-pure water, containing in either case 10 mM MgCl<sub>2</sub>, UDP-glucuronic acid (8 mM) and UDP-glucosamine (4 mM). I3G was isolated by semipreparative HPLC. All other drugs were from Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain).

### Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± SEM and n describes the number of measurements made (i.e., from different animals). Differences between experimental groups were treated using unpaired Student's t-test or, for multiple comparisons, using one-way analysis of variance followed by a Dunnett's post hoc test. P values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Effects of plasma metabolites on blood pressure

SHR showed a basal MBP of 181±5 mm Hg and HR of 424±14 bpm. Q3GA and I3GA (1 mg/kg i.v.) progressively reduced mean blood pressure (MBP) in SHR, while Q3'S was without effect. This hypotensive effect induced by both metabolites was statistically significant after 1 and 2 h, respectively, of the metabolite injection. The maximum effects observed at 3 h were 14.9±1.8% and 11.4±1.8%, respectively (Figure 2A). No significant changes in heart rate (HR) were observed with any metabolite (Figure 2B). Q3GA also decreases MBP at low concentrations (0.02 and 0.2 mg/kg) (Figure 2C), being also without effects on HR (Figure 1D).

### Time-course of the Q3GA concentrations in plasma

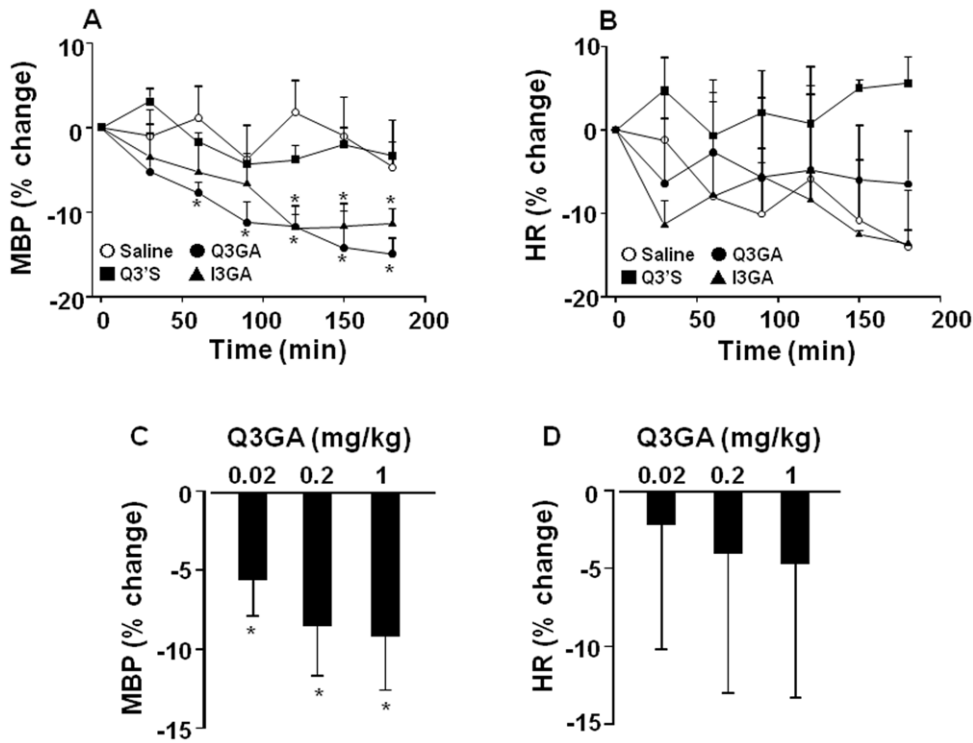
When SHR were treated with Q3GA, 1 mg/kg i.v., there was an increase in the plasma concentration of this metabolite reaching 23.2±1.8 μM at 1 min and decreased rapidly (<1 μM at 30 min) (Figure 3A, 3B). Moreover, free quercetin aglycone and I3GA was detected in plasma after Q3GA injection.

### Effects of metabolites in the reactivity of mesenteric artery

Phenylephrine induced a maximal contractile effect in mesenteric vessels from SHR of 19.4±0.9 mN (n=20). When mesenteric arteries from SHR were incubated with the aglycones quercetin or isorhamnetin for 30 min a significant concentration-dependent decrease in the vasoconstrictor response to phenylephrine was observed (Figure 4) while Q3GA at this time had no effect (Figure 5A). However, when the incubation of 25 μM Q3GA was prolonged to 1 and 2 hours a significant reduction in the vasoconstriction induced by phenylephrine was detected (Figure 5B and 5C).

### Role of glucuronidase activity in the hypotensive and vascular effects induced by Q3GA

To explore the possible role of deconjugation of Q3GA on the observed effects a specific inhibitor of beta-glucuronidase (SAL) was used, which was administered i.p. during the 3 days before the blood pressure recordings. Interestingly, the hypotensive effect of Q3GA was abolished in SHR treated with SAL (Figure 6A). We confirmed the inhibitory glucuronidase activity of SAL (1 mM) in homogenates from the mesenteric bed in *in vitro* conditions, by incubating during 1 h and measuring glucuronidase activity (Figure 6C). We also found that the inhibitory effects of Q3GA in the contractile response induced by phenylephrine were suppressed when mesenteric arteries were incubated with SAL (Figure 6D), but not those of quercetin (Figure 6E).



**Figure 2. Effects of intravenous Q3GA, Q3'S, and I3GA (1 mg/kg) and Q3GA (0.02, 0.2 mg/kg) on mean arterial blood pressure (A, C) and heart rate (B, D) measured by direct carotid artery recording in a conscious rat.** Results are means  $\pm$  SEM of 4–6 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. saline. doi:10.1371/journal.pone.0032673.g002

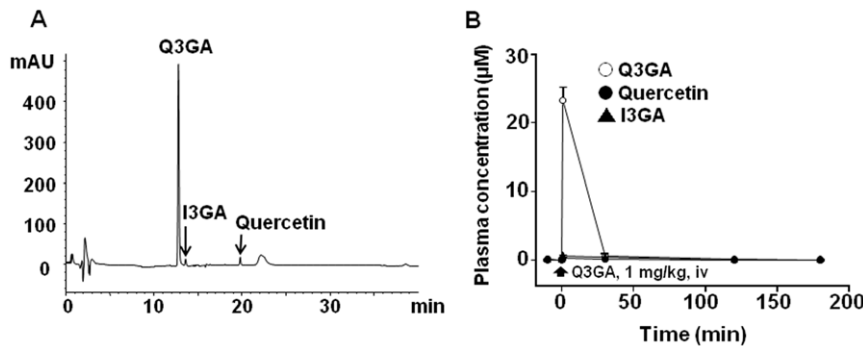
**Role of glucuronidase activity in the hypotensive and vascular effects induced by quercetin**

The above results prompted us to analyze whether deconjugation was also required for the antihypertensive effect of orally administered quercetin. Administration of quercetin (10 mg/Kg using an intragastric gavage) induced a progressive decrease in MBP and HR during 6 hours of register. These reductions were significant, as compared to vehicle, after 2.5 h of administration, and reached a maximum of  $28 \pm 4\%$  and  $18 \pm 2\%$ , respectively at 6 h (Figure 7A, 7B). Importantly, when SHR were treated with SAL, oral quercetin was unable to induce changes in both MBP and HR (Figure 7C, 7D). However, SAL was unable to modify the

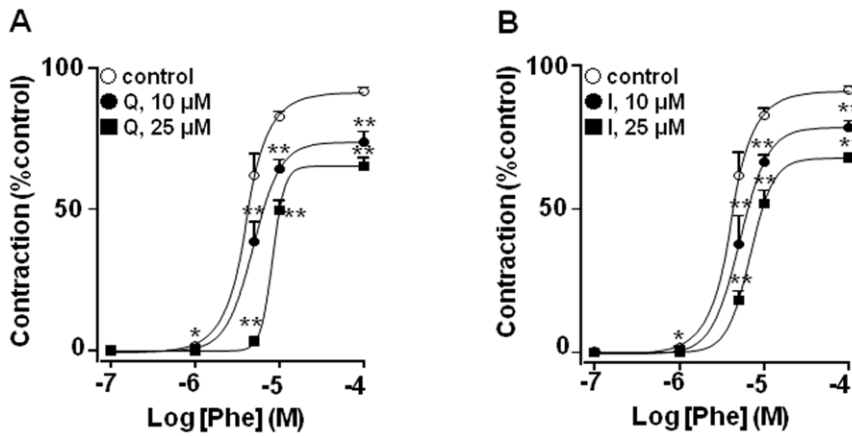
in vitro effect of quercetin on the contractile response to phenylephrine in isolated mesenteric arteries.

**Discussion**

Fruit and vegetable consumption is associated with a decrease in blood pressure, which is an important cardiovascular risk factor [30]. Quercetin, the most important dietary flavonol, present in multiple fruits and vegetables, reduces blood pressure in hypertensive animals and human after chronic consumption [9,13,31–37]. Herein, we show for the first time that the conjugated derivatives Q3GA and I3GA can exert antihypertensive effects when administered intravenously. As previously



**Figure 3. Concentrations of quercetin, I3GA, and Q3GA measured in plasma from SHR treated with 1 mg/kg Q3GA.** (A) HPLC chromatograms recorded at 370 nm of plasma samples taken at 1 min. (B) Time-concentration relationship. Results are means  $\pm$  SEM of 4 experiments. doi:10.1371/journal.pone.0032673.g003



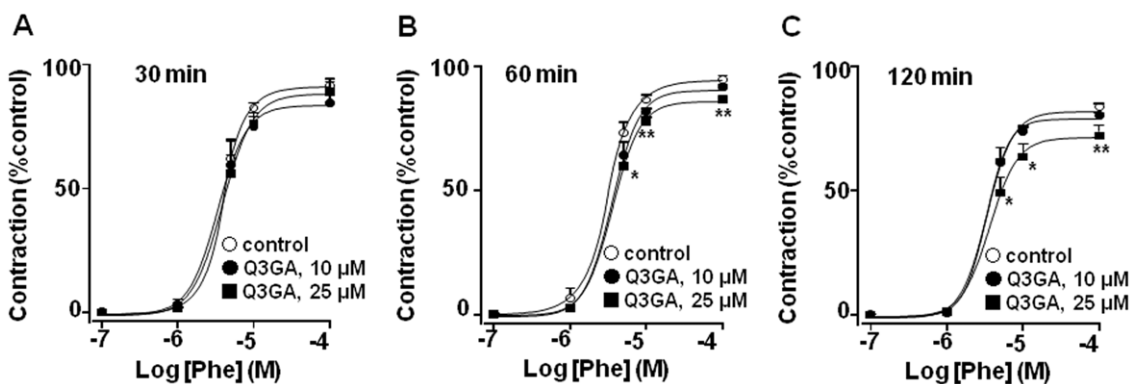
**Figure 4. Effects of (A) quercetin and (B) isorhamnetin (10 or 25 μM, incubated for 30 min) on the contractile responses to phenylephrine in mesenteric resistance arteries.** Control is treated with vehicle (DMSO). Results are means ± SEM of 4–8 experiments. \* P<0.05 and \*\*P<0.01 vs. control. doi:10.1371/journal.pone.0032673.g004

reported Q3GA had no acute effect *in vitro* (at 30 min), however it developed with more prolonged incubations. Both the *in vitro* and the *in vivo* effects were prevented by the β-glucuronidase inhibitor SAL. Taken together these data strongly suggest that deconjugation is required for the effect of quercetin metabolites. Moreover, oral quercetin reduced blood pressure by almost 30% in SHR, being this effect persistent at least during 6 hours and, importantly, this effect was also prevented by SAL, indicating that the sequence of liver-intestine conjugation and local (vascular) deconjugation processes is required for the antihypertensive effect of quercetin.

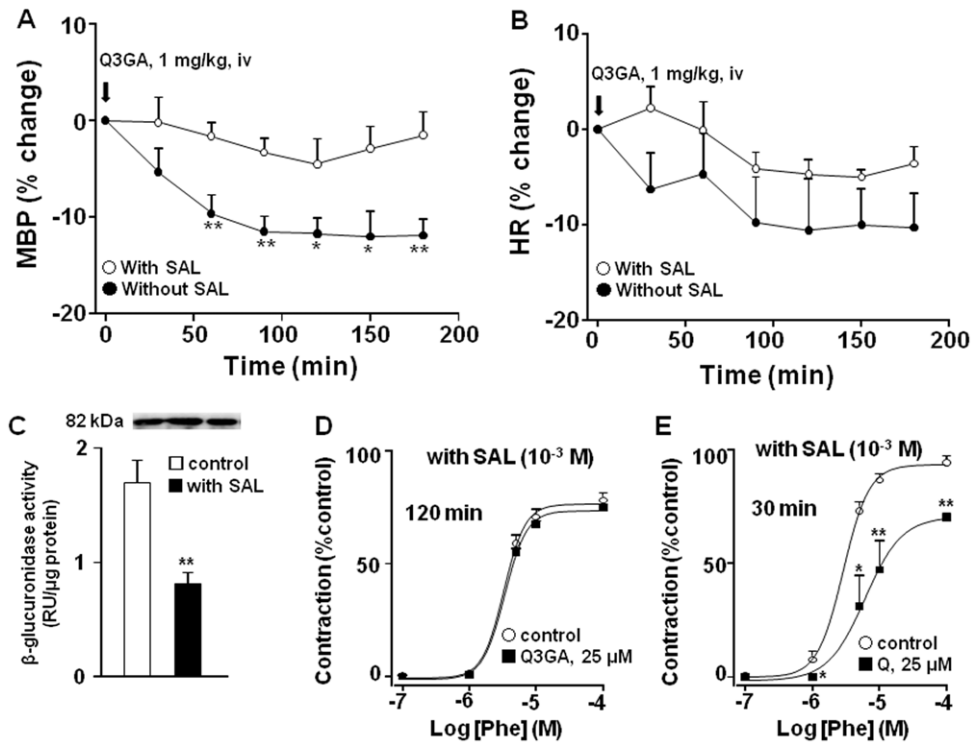
Both human and rat tissues, except for the cells lining the intestine tract, are exposed to quercetin via the blood. However, the free forms of quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin are barely detected in plasma, which raises the question of which is/are the compound(s) responsible for the antihypertensive activity. Because glucuronidated and sulfated compounds are the only detectable metabolites, it is suggested that conjugated metabolites must play a decisive role in the possible beneficial effects [38]. Our results support this hypothesis, because we showed that Q3GA and I3GA, the main plasma metabolites of quercetin exerted an antihypertensive effect. Doses of Q3GA as low as 0.02 mg/kg also significantly reduced blood pressure. In contrast, Q3'S was without effect. Herein, we show that both Q3GA and I3GA metabolites show a similar effect. Previous

published papers from other groups [15–18], the concentrations of methylated forms of quercetin are in the same range or higher than non methylated ones in rats and humans supplemented with quercetin, suggesting that both forms may contribute to the antihypertensive effect.

When we analyzed the time course of the antihypertensive effect and compared it to the plasma concentrations of Q3GA we found a clear dissociation (Fig. 2A vs Fig. 3B). In our experimental conditions, the dose of 1 mg/kg of Q3GA intravenously induced a peak plasma concentration of ~25 μM which is higher than that previously reported by da Silva et al. [39] of 9.6 μM 6 h after 10 mg/kg quercetin delivered via oral gavage. However, Q3GA rapidly disappeared from the plasma, indicating that the two modes of administration result in a completely different pharmacokinetic profile. The fast decay of Q3GA concentration in plasma is not compatible with renal excretion, suggesting that Q3GA is metabolized, accumulated in tissues or both. In a recent *in vitro* study [24], the perfusion of Q3GA through the rat mesenteric vascular bed resulted in a partial accumulation of Q3GA in the tissue and a progressive process of deconjugation. The resulting aglycone was partly found in the extracellular buffer and mostly retained intracellularly. The beta-glucuronidase inhibitor SAL increased the tissue Q3GA and reduced the aglycone. Deconjugation by beta-glucuronidase is expected to occur intracellularly



**Figure 5. Effects of Q3GA (10 or 25 μM) on the contractile responses to phenylephrine in mesenteric resistance arteries, after 30 (A), 60 (B) or 120 (C) min of incubation.** Results are means ± SEM of 4–8 experiments. \* P<0.05 and \*\*P<0.01 vs. control. doi:10.1371/journal.pone.0032673.g005



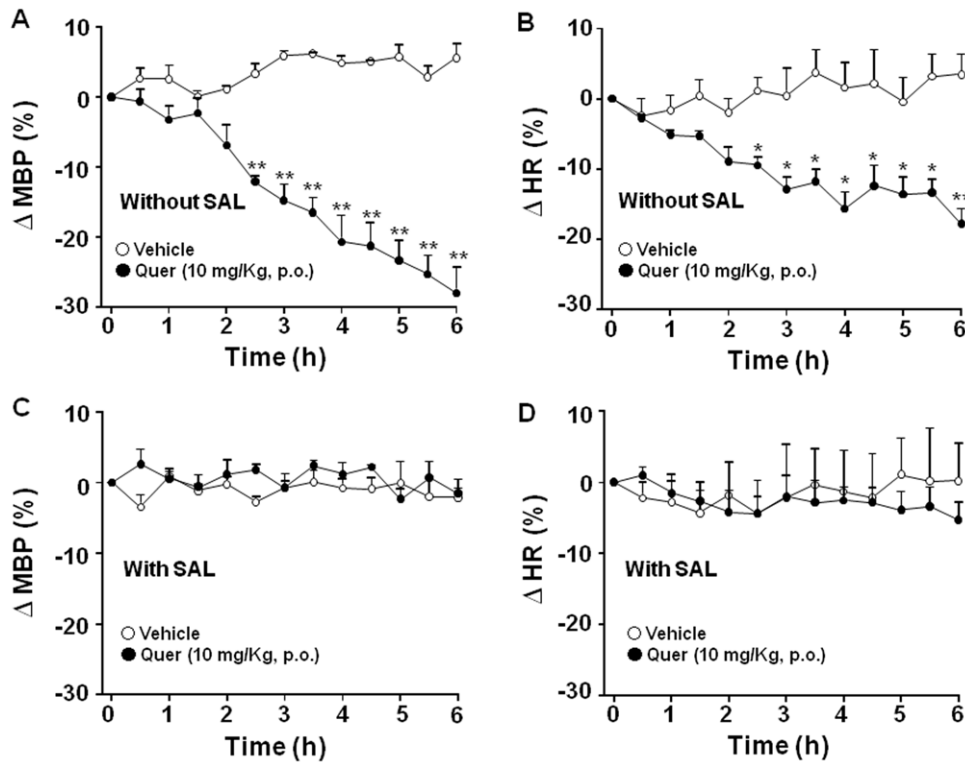
**Figure 6. Effects of Q3GA in arterial blood pressure (A) and heart rate (B) in SHR treated with SAL (10 mg/rat/day for 3 days) or vehicle (means ± SEM of 4 experiments).** Panel (C) shows the bands of β-glucuronidase expression by Western blot and the β-glucuronidase activity and its inhibition by SAL (1 mM) in vascular bed homogenates (means ± SEM of 8 experiments). (D) Effects of Q3GA (25 μM) on the contractile responses to phenylephrine in mesenteric arteries after 120 min in the presence of SAL (1 mM) (means ± SEM of 5 experiments). (E) Effects of quercetin (25 μM) on the contractile responses to phenylephrine in mesenteric arteries after 30 min in the presence of SAL (1 mM) (means ± SEM of 5 experiments). \* P<0.05 and \*\*P<0.01 vs. control. doi:10.1371/journal.pone.0032673.g006

because this enzyme is located in the lysosomes and the microsomal fraction. Therefore, the aglycone is formed within the vessel and probably in the cytosol of smooth muscle cells where it is expected to interact with its targets to exert vascular smooth muscle relaxation. The most plausible targets for this effect include the protein kinases involved in the regulation of myosin-actin interactions including protein kinase C, myosin light chain kinase or Rho kinase and possibly potassium channels [8,9,40,41]. Quercetin aglycone released to the plasma is likely to be rapidly re-conjugated in the liver explaining its low levels.

The vasorelaxant effects of quercetin and related metabolites have been widely assessed *in vitro* in aorta and perfused mesenteric bed [7,8,42]. Increased alpha-adrenergic response in small mesenteric arteries has been involved in increased blood pressure in SHR [43,44]. As expected, both quercetin and isorhamnetin incubated during 30 min, inhibited the contractile response induced by the alpha-adrenergic receptor agonist phenylephrine. In the same experimental conditions, Q3GA did not modify this response. These results are consistent with previous data showing that conjugation of flavonoids results in a decreased biological activity [45,46] and that conjugated metabolites have no direct vasorelaxant effect in isolated rat aorta at physiological concentrations [21]. However, when small mesenteric arteries were incubated for 1 or 2 h with Q3GA, at 25 μM, the vasoconstriction induced by phenylephrine was significantly reduced, suggesting that quercetin accumulates in this vascular bed and it is responsible of the reduced vascular tone. A similar scenario has been described previously in which quercetin metabolites in circulating blood can permeate through the injured/activated

endothelial cells and interact with the subintimal cells, such as the macrophages and smooth muscle cells [22,47]. Deconjugation of the glucuronide metabolites of the flavonoids by increased β-glucuronidase activity at the site of inflammation has been suggested as a plausible mechanism for the protective effects of flavonoids *in vivo* [23,48]. Accordingly, the release of β-glucuronidase is considered an index of lysosomal membrane integrity [49]. In fact, mesenteric bed from SHR expresses β-glucuronidase and its activity was significantly inhibited by SAL, a specific inhibitor. Vascular tissues from SHR showed increased expression of proinflammatory markers, altered endothelial function, and increased macrophage infiltration than normotensive animals [50,51], which could facilitate metabolite accumulation and deconjugation in this inflamed tissue. In our experiments, the antihypertensive effect of Q3GA was abolished by β-glucuronidase inhibition, which suggests that this effect requires β-glucuronidase-mediated deconjugation. Moreover, the inhibitory effect in the contractile response to phenylephrine in mesenteric arteries induced by Q3GA was also suppressed by SAL, showing that Q3GA requires deconjugation to exert this inhibitory effect.

Given the role of β-glucuronidase in the effects of Q3GA we aimed to analyze whether it was also relevant for the antihypertensive effect of quercetin. Surprisingly, despite several chronic studies, to our knowledge the effects of acute oral quercetin administration on blood pressure in hypertensive animals had not been studied. We found a slow developing but long lasting antihypertensive effect. Remarkably, the effects of oral quercetin were also abolished by β-glucuronidase inhibition with SAL. However, as expected, the *in vitro* effects of quercetin were



**Figure 7. Effects of oral quercetin (10 mg/kg) on arterial blood pressure (A, C) and heart rate (B, D) in SHR treated with SAL (10 mg/rat/day for 3 days) or vehicle (1 ml isotonic solution).** Results are means  $\pm$  SEM of 4 experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. quercetin vehicle (1 ml of 1% methylcellulose).

doi:10.1371/journal.pone.0032673.g007

unaffected by SAL. Thus, our data suggest that the biological activity of quercetin is dependent on the conjugation-deconjugation processes. Although decreased glucuronidation often results in increased activity and/or toxicity of drugs, paradoxically, glucuronidation seems to be required for the activity of quercetin. Therefore, glucuronidation may protect quercetin from its metabolism via other pathways and help to carry the flavonoid to the tissues where the free aglycone is released [52]. Our data also suggest that polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases (encoded by the UGT1 and UGT2 loci), which are common in humans [53] and changes in the  $\beta$ -glucuronidase activity, might result in a variable response to quercetin.

In conclusion, we show that glucuronides of quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin are involved in the antihypertensive response of oral quercetin, which might be related, at least in part, by the inhibitory effect in the  $\alpha$ -adrenergic-induced

hypercontractile response in resistance arteries. Quercetin could be initially inactivated by a conjugation metabolism during absorption and then safely be delivered to inflamed arterial wall, and the recruited metabolites are incorporated and converted to the aglycone in vascular smooth muscle cells and exert the inhibitory activity on vascular tone. These results are in agreement with the hypothesis that flavonoid glucuronides appear to serve as plasma transport metabolites to target cells rather than solely as excretion.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FP-V JD. Performed the experiments: PG IR-G SG-M MD RJ CM. Analyzed the data: RJ FV JT CS-B JD. Wrote the paper: FP-V JD.

### References

- Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20: 21–29.
- Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB (2002) Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 102: 1414–1420.
- Hertog MG, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007–1111.
- Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D (1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 156: 637–642.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J (2010) Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 31: 478–494.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 36: 317–322.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J (1993) Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 239: 1–7.
- Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, et al. (2002) Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 66–72.
- Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, et al. (2001) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 133: 117–124.
- Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, et al. (2006) Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 24: 75–84.
- Machha A, Mustafa MR (2005) Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 36–40.



12. Romero M, Jiménez R, Hurtado B, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, et al. (2010) Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 627: 242–250.
13. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, et al. (2007) Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 137: 2405–2411.
14. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80: 15–21.
15. Manach C, Morand C, Crespy V (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 24: 331–336.
16. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S–2085S.
17. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, et al. (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* 35: 941–952.
18. Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006) Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr* 96: 107–116.
19. Williamson G, Manach C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81: 243S–255S.
20. Lodi F, Jiménez R, Menendez C, Needs PW, Duarte J, et al. (2008) Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta Med* 74: 741–746.
21. Lodi F, Jimenez R, Moreno L, Kroon PA, Needs PW, et al. (2009) Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* 204: 34–39.
22. Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, et al. (2008) Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* 283: 9424–9434.
23. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM, et al. (2001) Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett* 503: 103–106.
24. Menendez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, et al. (2011) Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol Nutr Food Res* 55: 1780–1790.
25. Fittkau M, Voigt W, Holzhausen HJ, Schmoll HJ (2004) Saccharic acid 1,4-lactone protects against CPT-11-induced mucosa damage in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 130: 388–394.
26. Mulvany MJ, Halpern W (1997) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26.
27. Dueñas M, Mingo-Chornet H, Pérez-Alonso JJ, Di Paola-Naranjo R, González-Manzano AM, et al. (2008) Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Eur Food Res Technol* 227: 1069–1076.
28. Jones DJL, Jukes-Jones R, Verschoyle RD, Farmer PB, Gescher A (2005) A synthetic approach to the generation of quercetin sulfates and the detection of quercetin 3'-O-sulfate as a urinary metabolite in the rat. *Bioorgan Med Chem* 13: 6727–6731.
29. Plumb GW, O'Leary K, Day AJ, Williamson G (2003) In Santos-Buelga C, Williamson G, eds. *Methods in polyphenol analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 177 p.
30. Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J (2009) Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol* 6: 599–608.
31. Galisteo M, García-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Wangenstein R, et al. (2004) Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med* 70: 334–341.
32. García-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, et al. (2005) Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem* 270: 147–155.
33. Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y (2004) Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 892–896.
34. Jalili T, Carlstrom J, Kim S, Freeman D, Jin H, et al. (2006) Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 47: 531–541.
35. Yamamoto Y, Oue E (2006) Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 933–939.
36. Mackraj I, Govender T, Ramesar S (2008) The antihypertensive effects of quercetin in a salt-sensitive model of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 51: 239–245.
37. Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kürbitz C, Settler U, et al. (2009) Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* 102: 1065–1074.
38. Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Régéat F, et al. (1999) Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med* 27: 1259–1266.
39. da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J (1998) Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett* 430: 405–408.
40. Duarte J, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J (1994) Inhibitory effects of quercetin and staurosporine on phasic contractions in rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 262: 149–156.
41. Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM, Cobeño L, Moreno L, et al. (2007) The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res* 73: 424–31.
42. Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, et al. (2010) Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med* 49: 339–347.
43. Nyborg NC, Bevan JA (1988) Increased alpha-adrenergic receptor affinity in resistance vessels from hypertensive rats. *Hypertension* 11: 635–638.
44. Nomura Y, Asano M (2002) Increased Ca<sup>2+</sup> buffering function of sarcoplasmic reticulum in small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 25: 231–239.
45. Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J (2001) Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med* 30: 1274–1285.
46. Lotito SB, Frei B (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* 41: 1727–1746.
47. Mochizuki M, Kajiji K, Terao J, Kaji K, Kumazawa S, et al. (2004) Effect of quercetin conjugates on vascular permeability and expression of adhesion molecules. *Biofactors* 22: 201–204.
48. Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, et al. (2001) Deglucuronidation of a flavonoid luteolin monoglucuronide during inflammation. *Drug Metab Dispos* 29: 1521–1524.
49. Michihara A, Toda K, Kubo T, Fujiwara Y, Akasaki K, et al. (2005) Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 28: 947–951.
50. Sullivan JC, Semprun-Prieto L, Boesen EI, Pollock DM, Pollock JS (2007) Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1573–R1579.
51. Li L, Yi-Ming W, Li ZZ, Zhao L, Yu YS, et al. (2008) Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res* 58: 196–201.
52. Schewe T, Steffen Y, Sies H (2008) How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys* 476: 102–106.
53. Crettol S, Petrovic N, Murray M (2010) Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des* 16: 204–219.

## **ARTÍCULO 4**

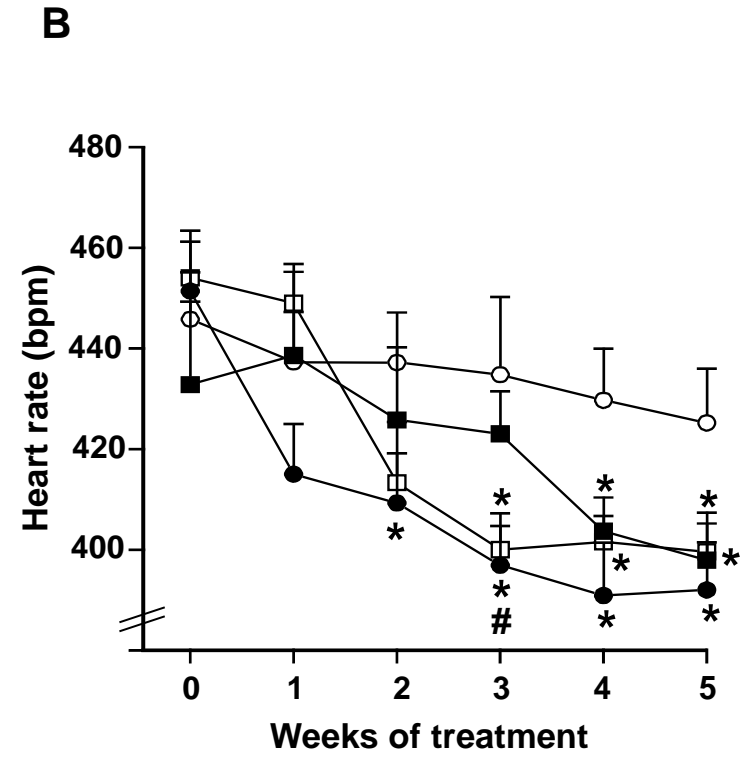
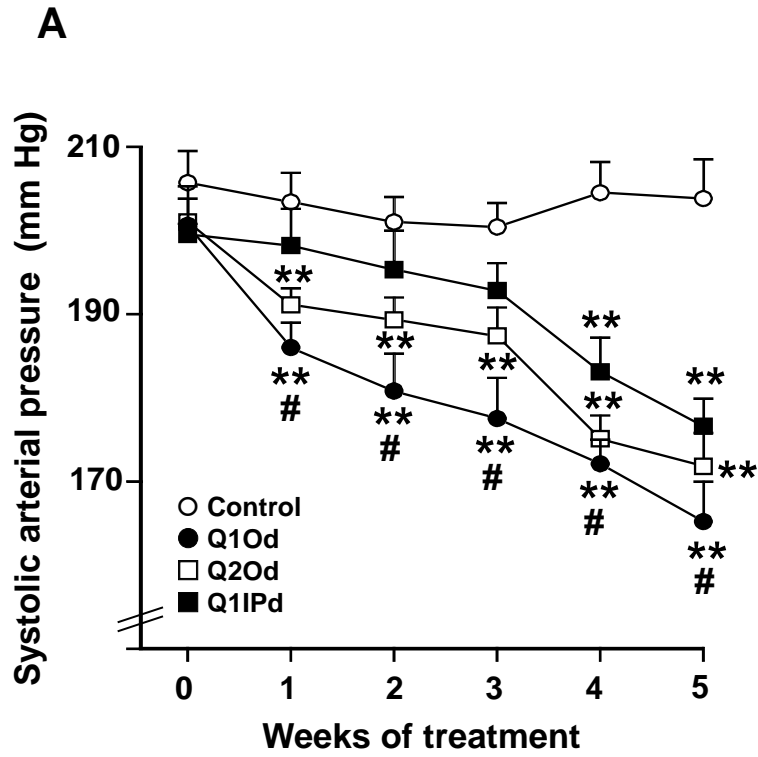
# **Different cardiovascular protective effects of quercetin administered by oral or intraperitoneal via in spontaneously hypertensive rats**

*Pilar Galindo*, Susana González-Manzano, Maria José Zarzuelo, Manuel Gómez-Guzmán, Ana María Quintela, Ana González-Paramás, Celestino Santos-Buelga, Francisco Perez-Vizcaino, Juan Duarte and Rosario Jimenez.

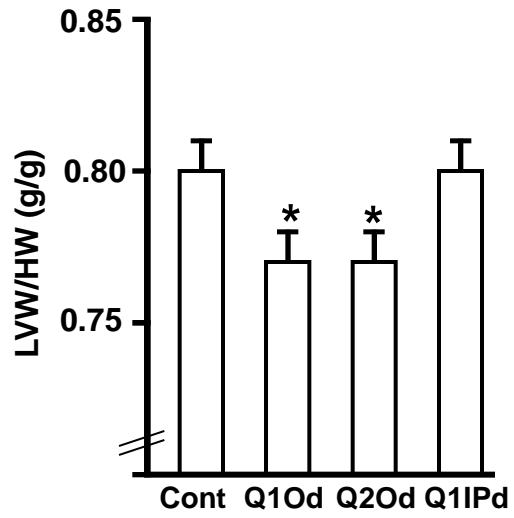
Food & Function (2012)

(in press)

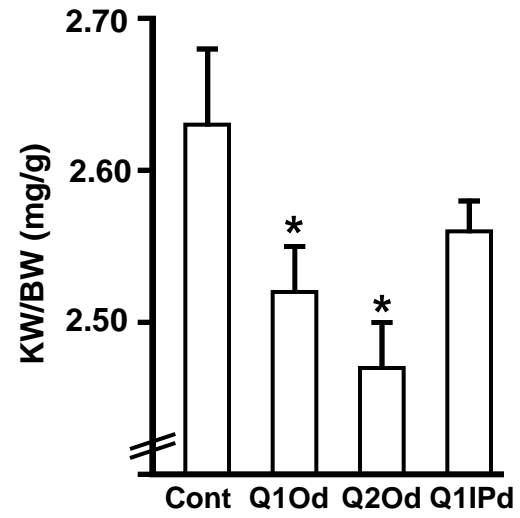
Figure 1



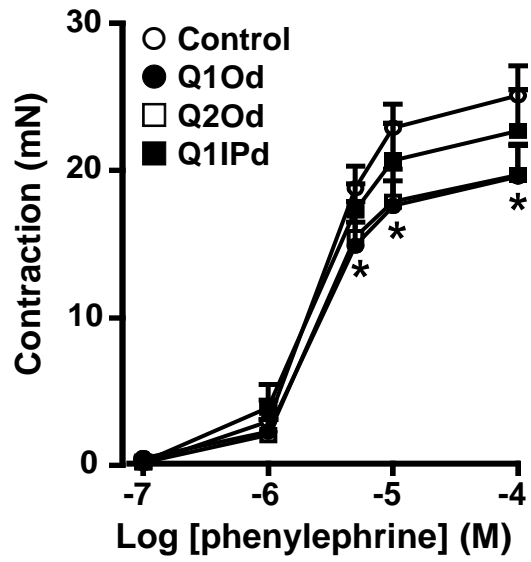
A



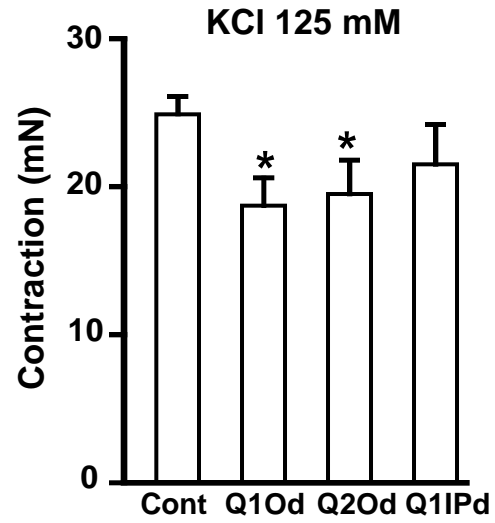
B



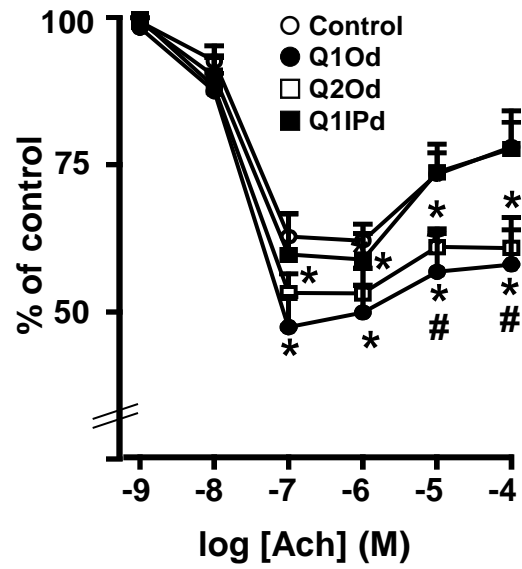
A



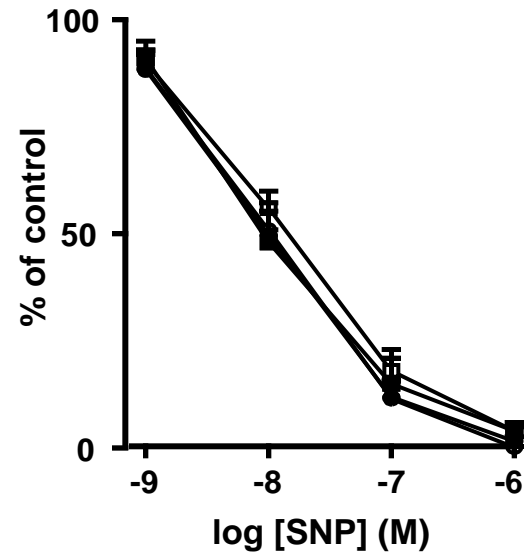
B



A



B



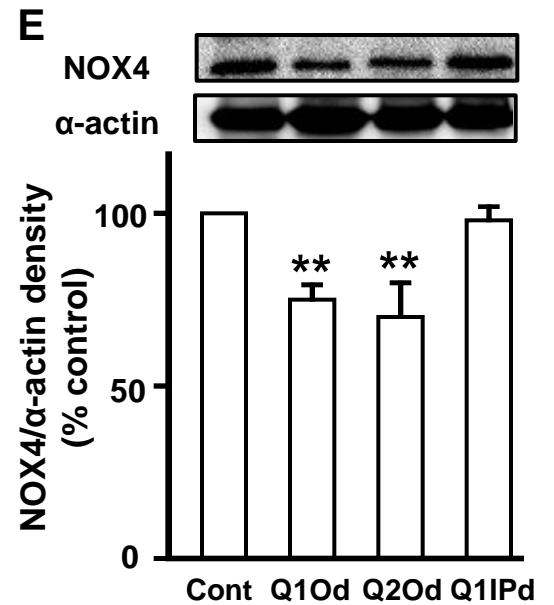
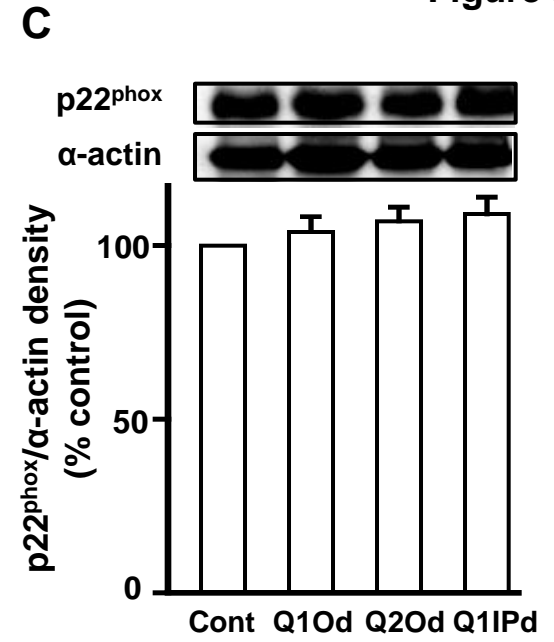
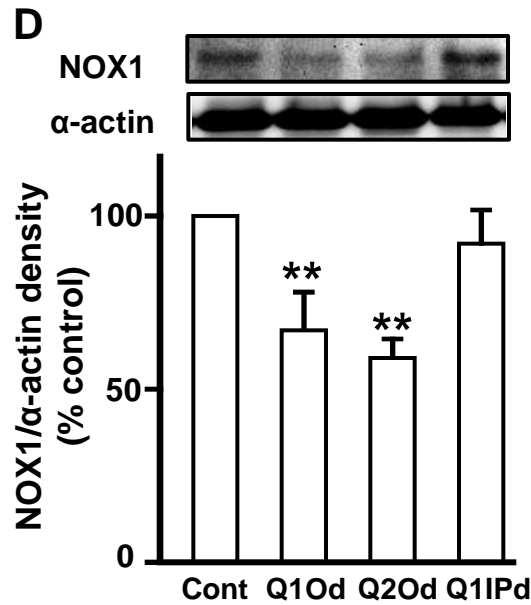
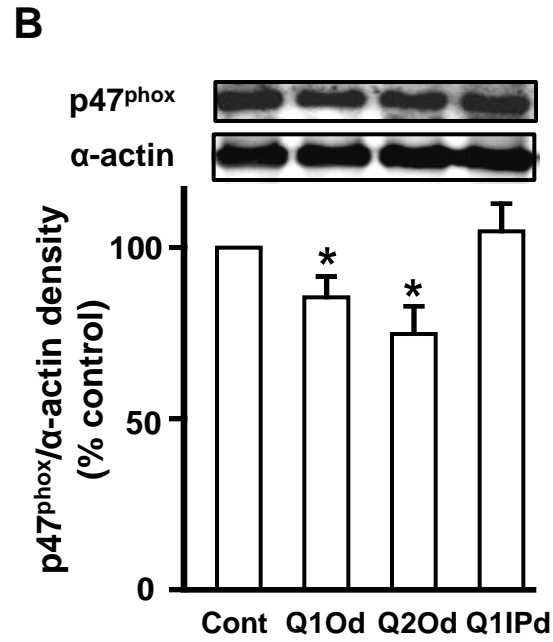
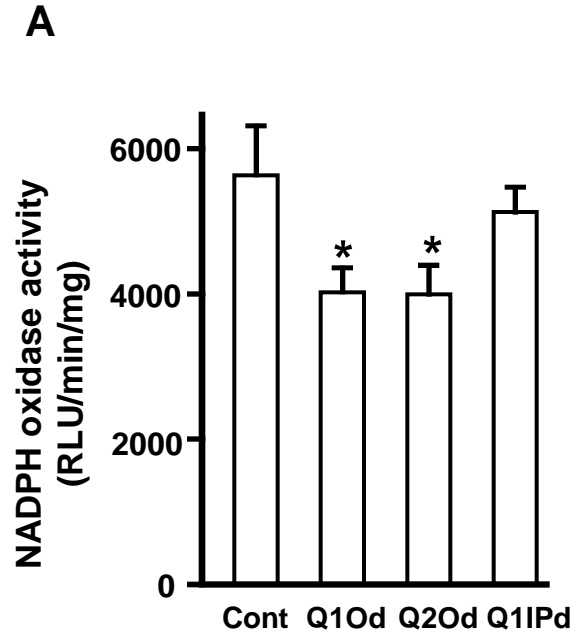
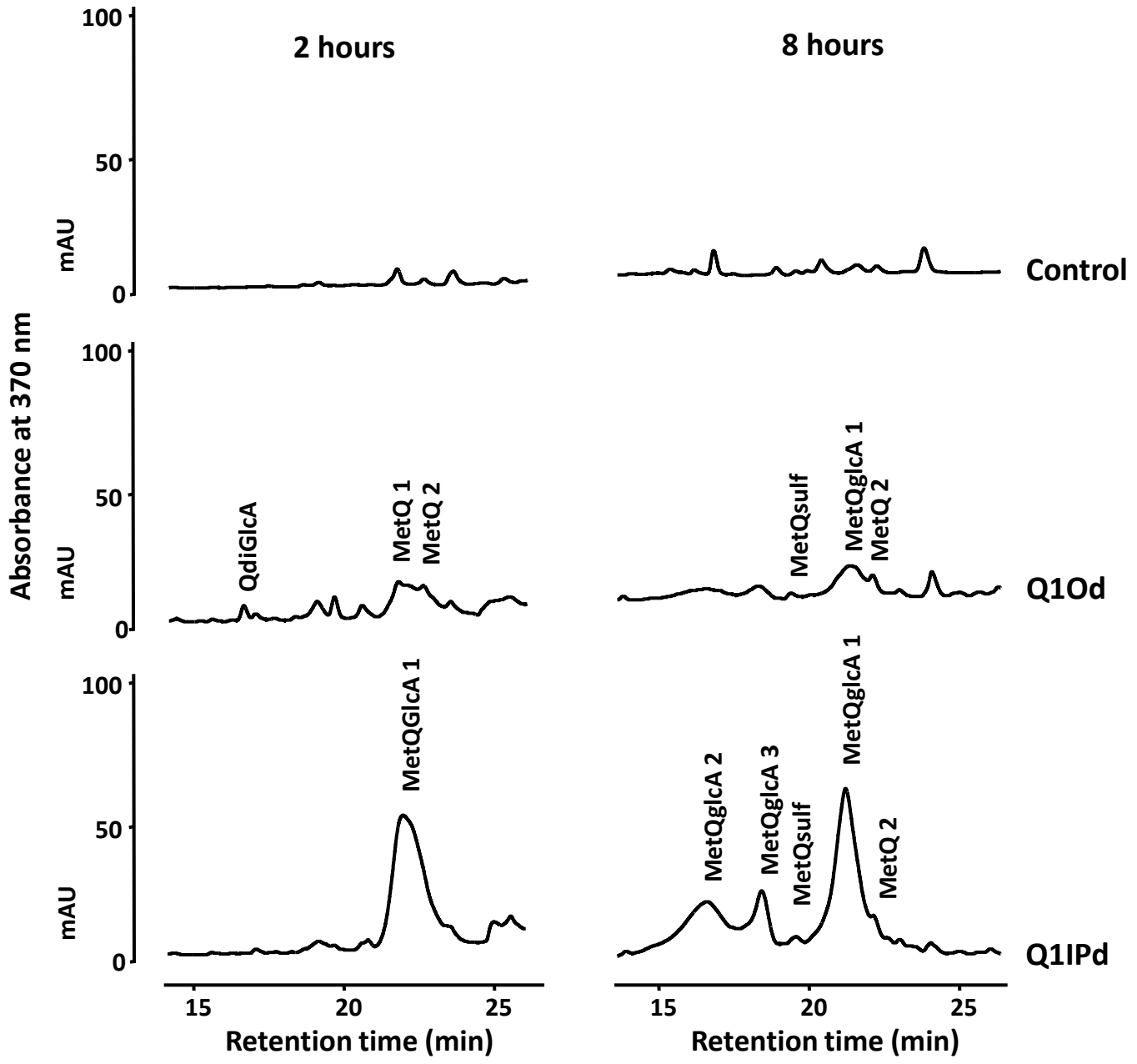


Figure 6





**Different cardiovascular protective effects of quercetin administered by oral or intraperitoneal via in spontaneously hypertensive rats.**

*P Galindo*<sup>1</sup>, *S González-Manzano*<sup>2</sup>, *MJ Zarzuelo*<sup>1</sup>, *M Gómez-Guzmán*<sup>1</sup>, *AM Quintela*<sup>1</sup>, *A González-Paramás*<sup>2</sup>, *C Santos-Buelga*<sup>2</sup>, *F Pérez-Vizcaíno*<sup>3</sup>, *J Duarte*<sup>1</sup>, *R Jiménez*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.

<sup>2</sup>Laboratorio de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC) and Ciber Enfermedades Respiratorias (Ciberes), Madrid, Spain.

Corresponding author: Juan Duarte. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain. Tel: +34 958241791; Fax: +34 958248964; e-mail: [jmduarte@ugr.es](mailto:jmduarte@ugr.es)

## **Abstract**

We tested whether the administration procedure of quercetin affects its metabolite profile and antihypertensive activity. SHR were randomly assigned to four experimental treatments: (1) 1 mL of 1% methylcellulose by oral gavage and 2% DMSO i.p. (control group) (2) 10 mg/kg quercetin by oral gavage once daily and 2% DMSO i.p. (3) 10 mg/kg quercetin by oral gavage divided in two daily doses (5+5 at 12 h intervals) and 2% DMSO i.p. (4) 1 mL of 1% methylcellulose by oral gavage and 10 mg/kg quercetin i.p. injection. Rats were treated daily for 5 weeks. Single dose and two daily doses, in a long-term oral treatment were equally efficient, both restoring the impaired aortic endothelium-dependent vasodilatation and reducing mesenteric contractile response to phenylephrine, systolic blood pressure, heart rate and heart and kidney hypertrophy. Attenuation of vascular NADPH oxidase-driven  $O_2^-$  production was also found in orally treated rats. Intraperitoneal administration reduced in lesser extent than oral administration the increased systolic blood pressure, being without effect in endothelial dysfunction and vascular oxidative stress. In contrast, greater levels of metabolites were quantified following intraperitoneal compared to oral administration at any time point, except for higher plasma methylated quercetin aglycone in oral as compared to intraperitoneal administration at 2 but not at 8 h. In conclusion, oral quercetin was superior to intraperitoneal administration to protect cardiovascular complications in SHR. No differences were found between the oral administration as a single daily dose or divided into two daily doses.

**Keywords:** quercetin, SHR, plasma metabolites, endothelial function.

## Introduction

The health benefits of consuming fruits and vegetables are often attributed, in part, to their high content of polyphenolic compounds<sup>1,2</sup>. The consumption of polyphenols in a plant-derived diet can be several times higher than the consumption of other phytochemicals and vitamins<sup>3,4</sup>. Among the polyphenols, flavonoids have attracted considerable attention. Epidemiological studies have found that an increased intake of dietary flavonoids is associated with a decreased mortality related to ischaemic heart disease<sup>5-7</sup>. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), a member of the flavonoid family, is one of the most widely dietary polyphenolic compounds in foods including vegetables, fruits, tea, and wine<sup>8</sup>. Several experimental studies have shown that quercetin exerts several biological effects including improved vascular reactivity and antihypertensive effects<sup>9-18</sup>. These antihypertensive effects are accompanied by a reduction of associated end-organ damage (cardiac hypertrophy, kidney histological alterations, proteinuria, vascular remodelling and endothelial dysfunction), as well as a decrease in the markers of oxidative stress in plasma, liver and urine<sup>19</sup>.

A quercetin-supplemented diet increased nitric oxide production in rat aorta<sup>20</sup> and reduced blood pressure and cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction<sup>21</sup>. However, Carlstrom et al.<sup>22</sup> reported no effects of this diet in spontaneous hypertensive rats (SHR). This result contrasts with other reports on cardiovascular protection when quercetin was delivered via oral gavage<sup>9,13,23</sup>. Furthermore, it has been shown that the metabolite profiles of quercetin in the plasma of rats are significantly affected by the administration procedure<sup>24</sup>. Thus, the bioavailability of quercetin aglycone could be a determining factor of its beneficial effects *in vivo*. Therefore, in this study we sought to determine whether different dosage regimens of quercetin (1 or two daily oral doses or 1 intraperitoneal dose) lead to different metabolite profile and different efficiency to

attenuate the severity of hypertension, vascular dysfunction and oxidant stress that develops in SHR.

## **Methods**

### **Animals and experimental groups**

Experiments followed our Institutional Guidelines for the ethical care of animals. Twenty-week old, male SHR rats were obtained from Harlan Laboratories (Barcelona, Spain). All rats were maintained five per cage at a constant temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), with a 12-hour dark/light cycle and on standard rat chow. An adaptation period of two weeks for vehicle administration and blood pressure measurements was allowed before the initiation of the experimental protocols. Forty SHR were randomly assigned to four experimental groups (n = 10 each): (1) 1 mL of 1% methylcellulose administered by an intragastric probe (oral gavage) and 2% DMSO i.p. (control group), (2) 10 mg/kg quercetin by oral gavage once daily and 2% DMSO i.p. (Q1Od), (3) 10 mg/kg quercetin by oral gavage divided in two daily doses (5+5 at 12 h intervals) and 2% DMSO i.p. (Q2Od), and (4) 1 mL of 1% methylcellulose by oral gavage and 10 mg/kg quercetin i.p. (Q1IPd). Rats were treated daily for 5 weeks. The quercetin treatment was stopped 2 days before the end of the experiment in order to study the long-term effects of quercetin without the involvement of the effects of acute administration.

In order to study the metabolite profile and antihypertensive activity of quercetin by the administration procedure another set of experiments were performed. Male SHR were given quercetin (10 mg/kg) either orally as a suspension in 1% methylcellulose or intraperitoneally as a solution in 2% DMSO for 2 weeks. The last day of treatment the animals were sacrificed either at 2 hours or 8 hours after the administration of the flavonoid. Plasma samples were collected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

### **Blood pressure measurements**

Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly 18-20 hours after administration of the drugs in conscious, pre-warmed, restrained rats by tail-cuff plethysmography<sup>25</sup>.

### **Cardiac and renal weight indices**

At the end of the experimental period, animals were anaesthetized with 2.5 mL/kg equitensin (i.p.) and blood was collected from the abdominal aorta. The heart and kidneys were excised, cleaned and weighed. The atria and the right ventricle were then removed and the remaining left ventricle weighed. The cardiac, left ventricular and renal weight indices were calculated by dividing the heart, left ventricle and kidney weight by the body weight.

### **Vascular reactivity studies**

The fourth branch of the mesenteric artery (1.7-2 mm in length) and descending thoracic aortic rings (2-3 mm) were dissected and mounted in a Mulvany wire myograph (model 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) and organ chambers, respectively, filled with Krebs solution (composition in mM: NaCl 118, KCl 4.75, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 and glucose 11) at 37 °C and gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Each mesenteric artery was stretched to its individual optimal lumen diameter, i.e., the diameter at which it developed the strongest contractile response to 62.5 mM K<sup>+</sup>, using a diameter-tension protocol<sup>26</sup>. Changes in arterial tone were recorded via a PowerLab/8A30 recording unit (ADInstruments Pty Ltd., Australia), and analyzed using Chart 5.0 acquisition system (ADInstruments). Concentration response curves to phenylephrine

( $10^{-7}$  M- $10^{-4}$  M) and a vasoconstrictor response to KCl 125 mM were performed in intact vessels.

Aortic rings were stretched to 2 g of resting tension by means of two L-shaped stainless-steel wires inserted into the lumen and attached to the chamber and to an isometric force-displacement transducer (Letigraph 2000), respectively, as previously described<sup>25</sup>. The concentration-relaxation response curves to acetylcholine ( $10^{-9}$  M- $10^{-5}$  M) were performed in aortic rings pre-contracted by  $10^{-6}$  M phenylephrine. In endothelium-denuded aorta, the concentration-relaxation response curves to nitroprusside (SNP,  $10^{-9}$  M- $10^{-5}$  M) were performed in the dark in rings without endothelium pre-contracted by  $10^{-6}$  M phenylephrine.

#### **NADPH oxidase activity**

The lucigenin-enhanced chemiluminescence assay was used to determine NADPH oxidase activity in intact aortic rings, as previously described<sup>27</sup>. Aortic rings from all experimental groups were incubated for 30 minutes at 37 °C in HEPES-containing physiological salt solution (pH 7.4) of the following composition (in mM): NaCl 119, HEPES 20, KCl 4.6, MgSO<sub>4</sub> 1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, NaHCO<sub>3</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.2 and glucose 5.5. Aortic production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> was stimulated by addition of NADPH (100 μM). Rings were then placed in tubes containing physiological salt solution, with or without NADPH, and lucigenin was injected automatically at a final concentration of 5 μM to avoid known artifacts when used a higher concentrations. NADPH oxidase activity were determined by measuring luminescence over 200 s in a scintillation counter (Lumat LB 9507, Berthold, Germany) in 5-s intervals and was calculated by subtracting the basal values from those in the presence of NADPH. Vessels were then dried, and

dry weight was determined. NADPH oxidase activity is expressed as relative luminescence units (RLU)/min/mg dry aortic tissue.

### **Western blots analysis**

Aortic homogenates were run on a sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrilamide electrophoresis. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF). Membranes were incubated overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-p47<sup>phox</sup> (1:1000, Millipore), monoclonal mouse anti-p22<sup>phox</sup> (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit NOX4 (1:1000, Novus Biologicals), or polyclonal rabbit NOX1 (1:2000, Novus Biologicals). Antibody binding was detected by an ECL system (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK) and densitometric analysis was performed using Scion Image-Release Beta 4.02 software (<http://www.scioncorp.com>)<sup>25</sup>. Samples were re-probed for expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin.

### **Extraction and analysis of quercetin metabolites from rat plasma**

Plasma samples were extracted with the same volume of methanol/0.5 M acetic acid (80:20, v/v) for 30 min at 25 °C in an ultrasonic bath, and then centrifuged for 3 min at 3500g. The supernatant was collected and the pellet submitted to the same process further two times, assisted by sonication (1 min) using a Microson<sup>TM</sup> XL-2000 ultrasonic cell disruptor (Misonix Inc., New York, USA). The methanolic extracts obtained from 6 rats were pooled and dried in a centrifugal concentrator micVac (GeneVac, Ipswich, United Kingdom). The residue was dissolved in 120  $\mu$ L acetonitrile/water (30:70 v/v) and centrifuged (5 min, 3500g) previous to its injection (100  $\mu$ L) in HPLC-DAD-ESI/MS.

HPLC-DAD-ESI/MS analyses were carried out in a Hewlett-Packard 1100 chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a quaternary pump and a diode array detector (DAD) coupled to an HP Chem Station (rev. A.05.04) data-processing station. An Ascentis™ RP-Amide 3 μm (2.1 x 150 mm) column thermostatted at 30 °C was used. The solvents used were: (A) 0.1% formic acid, and (B) acetonitrile. An elution gradient was established from 15 to 50% B over 15 min, isocratic 50% B for 10 min, from 50 to 75% B over 3 min, isocratic 75% B for 10 min, and re-equilibration of the column, at a flow rate of 0.2 mL/min. Double online detection was carried out in the DAD using 370 nm as a preferred wavelength and in a mass spectrometer (MS) connected to HPLC system via the DAD cell outlet. MS analyses were performed in a Finnigan™ LCQ (Thermoquest, San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source and an ion trap mass analyser, which were controlled by the LCQ Xcalibur software. Both the auxiliary and the sheath gases were nitrogen at flow rates of 20 and 80 L/min, respectively. The source voltage was 4.5 kV, the capillary voltage was 39 V, and the capillary temperature was 195 °C. Spectra were recorded in positive ion mode between  $m/z$  150 and 1500. The mass spectrometer was programmed to record a full mass and MS<sup>2</sup> scans of the most abundant ion in the full mass, using a normalised energy of collision of 45%. Quantitative analysis of quercetin and conjugated metabolites was performed from their chromatographic peaks recorded at 370 nm by comparison with calibration curves obtained by injection of increasing concentrations of quercetin and quercetin 3-*O*-glucuronide.

### **Statistical analysis.**

Results are expressed as means ± SEM and  $n$  reflects the number of animals. Statistically significant differences between groups were calculated by Students'  $t$  test for unpaired observations or for multiple comparisons by an ANOVA followed by a



Newman Keuls test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Concentration-response curves were fitted to a logistic equation and from these plots the maximal effect ( $E_{max}$ ) and the negative logarithm of the concentration producing half maximal response ( $pD_2$ ) were calculated.

## **Results**

### **Blood pressure, cardiac and renal hypertrophy**

Chronic administration (5 weeks) of oral quercetin (10 mg/kg) resulted in a progressive decrease in SBP from the first week of treatment (Figure 1A). The effect tended to be more efficacious when given as a single daily dose (Q1Od) than when the dose was divided into two administrations at 12 h intervals (Q2Od), but this difference was not significant. Chronic oral quercetin treatments also significantly reduced heart rate (HR) after the second (Q1Od group) or third (Q2Od group) week compared to control rats (final HR,  $392 \pm 9$  and  $400 \pm 8$  bpm, respectively, vs  $425 \pm 10$  bpm in control rats, Figure 1B). Likewise, in the group treated with quercetin by intraperitoneal injection (Q1IPd) a decrease in SBP and HR was observed, which was statistically significant only in the last two weeks of treatment. No statistical differences between Q1IPd and Q2Od in both parameters were found. However, we found a different time course and less intensive antihypertensive effect in the Q1IPd group as compared to the Q1Od group (final decrease in SBP:  $13.5 \pm 1.6$  vs  $18.1 \pm 2.4\%$ , respectively,  $P < 0.05$ ).

At the end of the experimental period, animals of the oral groups showed significantly decreased left ventricular and renal weight indices, as compared with the animals of the control group. No significant modifications of these parameters were observed in the rats receiving quercetin intraperitoneally (Figure 2).

### **Effects on responses to vasoconstrictors in mesenteric resistance arteries**

Both oral treatments of quercetin caused a downward shift in the phenylephrine concentration response-curve in mesenteric arteries, without affecting  $pD_2$  (Figure 3A, Table 1) and the response to 125 mM KCl was also reduced as compared to the control group (Figure 3B). In contrast, the chronic intraperitoneal administration of quercetin did not affect either the phenylephrine or the KCl response (Figure 3, Table 1).

### **Effects on nitric oxide mediated-vasodilator responses in thoracic aorta**

Aortas from SHR showed significantly reduced endothelium- and nitric oxide (NO)-dependent vasodilator responses to acetylcholine in arteries stimulated by phenylephrine, as compared to normotensive Wistar Kyoto rats<sup>9</sup>. Quercetin (10 mg/kg) administered either at one oral dose/day or two oral doses/day produced a significant increase in the relaxation induced by acetylcholine, being without effect in rats treated with the same dose of the flavonoid i.p. (Figure 4A). Furthermore, no differences in any group were observed in the endothelium-independent vasodilator responses to the NO donor SNP in vessels pre-contracted with phenylephrine (Figure 4B).

### **Effects on NADPH oxidase activity and p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, NOX1 and NOX4 subunits expression in thoracic aorta**

NADPH increases lucigenin-enhanced luminescence in normal aortic rings, which was almost abolished by previous incubation for 30 min with the flavoprotein inhibitor DPI (10  $\mu$ M) (not shown), showing that external NADPH increased NADPH oxidase activity in vascular tissue. NADPH oxidase activity was decreased significantly in aortic rings from groups treated with oral quercetin as compared to control rats, being without effect in rats treated intraperitoneally (Figure 5A). Chronic oral but not chronic

i.p. treatments with quercetin reduced protein expression of the NADPH subunits p47<sup>phox</sup> (Figure 5B), NOX1 (Figure 5D) and NOX4 (Figure 5E). Any changes in p22<sup>phox</sup> protein expression were detected after treatments with quercetin (Figure 5C).

### **Quercetin metabolites in rat plasma from two administration routes**

The plasma samples obtained after 2 and 8 hours of oral (intra-gastrical) or intraperitoneal administration of quercetin (10 mg/kg) were analyzed by HPLC-DAD-MS (Figure 6). Peaks identified as quercetin metabolites in the chromatograms yielded a common product ion at  $m/z$  303 and showed absorption spectra with maximum wavelength of absorption around 360-370 nm. Identities of the compounds were tentatively assigned according to their pseudomolecular ions, i.e., methylquercetin ( $[M+H]^+$  at  $m/z$  317), methylquercetin glucuronide ( $[M+H]^+$  at  $m/z$  493), methylquercetin sulfate ( $[M+H]^+$  at  $m/z$  397) and methylquercetin diglucuronide ( $[M+H]^+$  at  $m/z$  655). Curiously, none of the two detected methylquercetins corresponded to isorhamnetin or tamarixetin, as checked by comparison with authentic standards. The concentrations of the quantifiable metabolites are shown in the Table 2.

The major metabolites found corresponded to different methylated forms of quercetin, either free or glucuronidated, although distinct metabolite profiles were found following oral or intraperitoneal administration, as well as at the different times of blood collection. After oral administration mostly free methylquercetin forms were observed at 2 hours whereas a glucuronidated derivative also appeared at 8 hours. However, a methylquercetin glucuronide was already found after intraperitoneal administration at 2 hours, and continued being prominent after 8 hours, at which other methylquercetin glucuronides were also observed. A sulfated methylquercetin was also detected as a minor metabolite in both oral and intraperitoneal assays at 8 hours. Greater

levels of total metabolites were quantified following intraperitoneal than oral administration at the two time points.

## **Discussion**

Herein, we describe for the first time that the route (oral *vs* intraperitoneal) of chronic administration of quercetin alters the time course and the efficacy of its antihypertensive effects in SHR and its protective effect in target organs, such as heart, kidneys and endothelium, being oral administration more effective than intraperitoneal injection. In contrast, greater levels of metabolites were quantified following intraperitoneal compared to oral administration at any time point, except for higher plasma methylated quercetin aglycone in oral as compared to intraperitoneal administration at 2 but not at 8 h. These data confirm that the method of quercetin delivery is a critical determinant of the biological effect.

We found that under the same dose level of quercetin, the efficacy of a single administration (10 mg/kg) and two daily doses (5 + 5 mg/kg at 12h intervals) was comparable; both dosage regimens reduced similarly blood pressure, and heart and kidney hypertrophy, and restored the impaired aortic endothelium-dependent vasodilatation. If any, differences favoured the single *vs* the two daily doses. Clinical trials reporting the antihypertensive effects of quercetin have used a single dose (150 mg, <sup>28</sup>) or two daily doses (2 x 365 mg, <sup>15</sup>) but they have not been directly compared. If our data could be translated to humans, a single daily dose should be equivalent (or possibly better) than repeated doses. We speculate that this might also have nutritional relevance because it suggests that a single flavonoid-rich meal per day might be sufficient to afford cardiovascular protection.

In contrast to our method of administering quercetin via oral gavage, other ways of incorporating quercetin directly into the diet and allowing *ad libitum* consumption have been employed. A quercetin-supplemented diet increased nitric oxide production in rat aorta<sup>20</sup> and reduced blood pressure and cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction<sup>21</sup>. However, Carlstrom et al.<sup>22</sup> did not find any effect of a quercetin-supplemented diet while the oral administration of quercetin via gavage was effective in preventing cardiovascular complications in SHR. Those authors explained the different behaviour by the higher peak plasma quercetin levels achieved after gavage as compared to those achieved in diet-supplemented quercetin. Similarly, Kawai et al.<sup>24</sup> found that the profile of metabolites and the antioxidative capacity in the plasma of rats was significantly affected by the administration procedure. Thus, plasma extracts rich in conjugated metabolites from free-access supplemented-quercetin diet were less effective regarding their *in vitro* antioxidant activity towards LDL oxidation than those from the oral group.

Compounds administered i.p. are absorbed primarily through the portal circulation and, therefore, must pass through the liver where they may be metabolized before reaching other organs<sup>29</sup>. In contrast, compounds administered orally are subject to potential degradation and metabolism by enzymes from the host and the microbiota in the gastrointestinal lumen. During intestinal absorption, compounds are subject to potential metabolism in the epithelial cells before they reach the portal circulation and finally the liver. Therefore, hepatic and peripheral metabolism is common to oral and i.p. administration while intraintestinal and epithelial metabolism are exclusive to the oral treatment. As a rule, intraperitoneal administration is expected to lead to higher drug bioavailability. Quercetin glycosides are known to be hydrolyzed by the microbiota, releasing the free aglycone which can be further degraded into simpler

polyphenols or phenolic acids<sup>30,31</sup>. During absorption quercetin can be also conjugated in the intestinal wall<sup>32,33</sup>. Finally, quercetin or its metabolites are subject to hepatic metabolism (methylation and conjugation with glucuronide and sulphate,<sup>34</sup>) and further metabolism in peripheral tissues (deconjugation and oxidation into phenolic acids,<sup>35,36</sup>).

In the present study we found that the route of administration is a critical determinant for the time course and effectiveness of the cardiovascular protection in SHR. In fact, chronic quercetin administration intraperitoneally also reduced SBP, but only after 3 weeks of treatment, and in this case it was not accompanied by a protection in target organs and endothelial function. This lack of protective effects in the morphology of the heart and kidneys despite low SBP at the end of the experiment (5 weeks) compared to control might be explained by an insufficient time to regress organ hypertrophy. The *ex vivo* response to vasoconstrictors (KCl and phenylephrine) was also reduced in mesenteric vessels only after chronic oral quercetin, as compared to control and intraperitoneal administration. In vessels from SHR and essential hypertensive patients, an enhanced production of endothelial superoxide anion has been described<sup>37,38</sup>, and this effect has been related to the impairment of endothelium-dependent relaxation<sup>38</sup>. The NADPH oxidase complex was originally described in phagocytes, and is comprised of the membrane-bound catalytic core NOX2 (previously named gp91<sup>phox</sup>) and p22<sup>phox</sup>, the small G-protein Rap1A, and the cytosolic components p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and p40<sup>phox</sup>. At least 3 catalytic NADPH oxidase subunits (NOXs) are expressed in the rodent vasculature, NOX1, NOX2, and NOX4<sup>40,41</sup>, which were upregulated in SHR<sup>42</sup>. The expression of other noncatalytic, regulatory subunits correlate with hypertension, for example, p47<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup>. Vascular NADPH oxidase are not only a major source of vascular reactive oxygen species in the aortas from SHR, but also functionally contribute to the impairment of endothelium-dependent

relaxation, since the unspecific NADPH oxidase inhibitor, apocynin, and the more novel and apparently specific NADPH oxidase inhibitor, VAS2870, improved the blunted endothelium-dependent relaxation in SHR<sup>13,41,43</sup>. Chronic oral quercetin treatment in SHR also improved endothelial function<sup>9,13,23,44,45</sup> and reduced aortic O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by reducing NADPH oxidase activity, as a result of down-regulation of NADPH oxidase subunits, such as p47<sup>phox</sup><sup>13,23</sup>. In the present study, both oral treatments with quercetin reduced p47<sup>phox</sup>, NOX1 and NOX4 subunits expression and NADPH oxidase activity. Moreover, there was a good correlation between reduced aortic NADPH oxidase activity and improvement of endothelium- and NO-mediated relaxation to acetylcholine in isolated aorta. Thus, quercetin administration intraperitoneally was unable to improve endothelial dysfunction and to reduce both NADPH oxidase activity and protein expression of any NADPH oxidase subunits.

The present study also revealed that both the absolute amount and the profile of quercetin metabolites in plasma after oral administration was different to those found following intraperitoneal administration. As could be expected from a more direct administration route, concentrations of metabolites as a whole were higher after 2 or 8 h of intraperitoneal administration compared to the oral one, indicating a higher bioavailability. However, this absolute higher bioavailability did not predict a higher efficacy, indicating that the profile of the metabolites is essential for the activity. A number of different compounds were identified consistent with the previously reported complex metabolism of quercetin<sup>24,46,47</sup>. In SHR, quercetin aglycone was undetectable and there was a strong methylation of the flavonoid at 2 and 8 h regardless of the administration route, supporting previous observations in rats and humans that indicate that quercetin is mainly metabolized by methylation. However, 3' and 4' methyl derivatives, i.e. isorhamnetin and tamarixetin, have been the metabolites usually

reported<sup>46,47</sup> while, surprisingly, in the present study none of the two detected unconjugated methylquercetins corresponded to isorhamnetin or tamarixetin, as compared with authentic standards. The unconjugated methylquercetins were found as the main metabolites in plasma 2 hours after oral administration accompanied by a glucuronidated methylquercetin at 8 h. In contrast, rat plasma after intraperitoneal administration contained essentially high levels of glucuronidated methylquercetins and relatively minor amounts of sulphated and unconjugated metabolites.

Our previous results also showed that quercetin conjugated metabolites (quercetin-3-glucuronide, quercetin-3'-O-sulfate or isorhamnetin-3-O-glucuronide) have no direct acute vasorelaxant effect in isolated rat aorta<sup>48</sup> or in mesenteric arteries (unpublished). But recently, we have shown that, in *in vitro* conditions, long term (3 hours) incubation with quercetin-3-glucuronide induced a progressive inhibitory effect on vascular contraction in a concentration- and time-dependent manner<sup>35</sup>. Moreover, we found that quercetin-3-glucuronide lowered SBP *in vivo* in SHR<sup>36</sup>. These effects were prevented by inhibition of beta-glucuronidase demonstrating that this was due to local deconjugation of the glucuronide and subsequent quercetin accumulation. Nevertheless, concentrations of quercetin-3-glucuronide higher than quercetin aglycone were required to produce vasorelaxant effects.

Taken together, the differences in efficacy of the two routes of administration might be related to the different profiles in plasma metabolites, with higher levels of methylquercetin aglycones and lower of conjugated (glucuronidated) metabolites after oral administration at least at 2 h. However, we cannot discard that other undetected metabolites can be responsible for the higher efficacy of the oral administration. Recently, an interesting hypothesis has been raised proposing that polyphenols are metabolized by the resident microbiota in the colon and the metabolites entering the



systemic circulation may be responsible for the *in vivo* effects<sup>49</sup>. Our results showing that intraperitoneal administration of quercetin is effective in lowering SBP indicate that the intestinal metabolism by enzymes from the host or the microbiota is not essential for the activity of quercetin if we exclude a possible role of metabolism of excreted compounds in the bile followed by re-absorption. However, the higher activity of orally administered quercetin is consistent with the view that intestinal metabolism enhances the efficacy of quercetin as antihypertensive.

## **Conclusion**

In conclusion, we found that chronic oral quercetin induced a faster and stronger decrease in SBP than intraperitoneal quercetin, and that there were no significant differences in the efficacy of oral quercetin as antihypertensive when given as a single daily dose or when it was divided into two daily doses. Moreover, target organ protection was not afforded at 5 weeks by intraperitoneal quercetin, possibly related to the slower effect on SBP. Overall bioavailability, considered as the sum of detected metabolites, was higher after intraperitoneal administration. However, we found higher plasma levels of methylquercetins, as aglycones, during the early hours after the oral administration which might account for the higher efficacy of the oral route.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (grants CSD2007-00063, AGL2007-66108, SAF2008-03948 and SAF 2011-28150); and by the Instituto de Salud Carlos III (Red HERACLES RD06/0009), Spain.

## **References**

- 1 P. M. Kris-Etherton, M. Lefevre, G. R. Beecher, M. D. Gross, C. L. Keen and T. D. Etherton, Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis, *Annu. Rev. Nutr.*, 2004, **24**, 511-38.
- 2 M. F. Ullah and M. W. Khan, Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2008, **9**, 187-95.
- 3 A. Scalbert and G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.*, 2000, **130**, 2073S-85S.
- 4 C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727-47.
- 5 M. G. Hertog, E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet*, 1993, **342**, 1007–11.
- 6 P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Jarvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen and A. Aromaa, Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**, 560–8.
- 7 I. C. Arts and P. C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, **81**, 317S–25S.
- 8 J. V. Formica and W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem, Toxicol.*, 1995, **33**, 1061–80.
- 9 J. Duarte, R. Pérez-Palencia, F. Vargas, M. A. Ocete, F. Pérez-Vizcaino, A. Zarzuelo and J. Tamargo, Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats, *Br. J. Pharmacol.*, 2001, **133**, 117-24.

- 10 J. Duarte, R. Jiménez, F. O'Valle, M. Galisteo, R. Pérez-Palencia, F. Vargas, F. Pérez-Vizcaíno, A. Zarzuelo and J. Tamargo, Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats, *J. Hypertens.*, 2002, **20**, 1843-54.
- 11 M. Galisteo, M. F. García-Saura, R. Jiménez, I. C. Villar, R. Wangenstein, A. Zarzuelo, F. Vargas and J. Duarte, Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil, *Planta Med.*, 2004, **70**, 334-41.
- 12 M. F. García-Saura, M. Galisteo, I. C. Villar, A. Bermejo, A. Zarzuelo, F. Vargas and J. Duarte, Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension, *Mol. Cell Biochem.*, 2005, **270**, 147-55.
- 13 M. Sánchez, M. Galisteo, R. Vera, I. C. Villar, A. Zarzuelo, J. Tamargo, F. Pérez-Vizcaíno and J. Duarte, Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.*, 2006, **24**, 75-84.
- 14 I. Mackraj, T. Govender, and S. Ramesar, The antihypertensive effects of quercetin in a salt-sensitive model of hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2008, **51**, 239-45.
- 15 R. L. Edwards, T. Lyon, S. E. Litwin, A. Rabovsky, J. D. Symons and T. Jalili, Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects, *J. Nutr.* 2007, **137**, 2405-11.
- 16 Y. Yamamoto Y and E. Oue, Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, **70**, 933-9.
- 17 M. F. Montenegro, E. M. Neto-Neves, C. A. Dias-Junior, C. S. Ceron, M. M. Castro, V. A. Gomes, A. Kanashiro and J. E. Tanus-Santos, Quercetin restores plasma nitrite

- and nitroso species levels in renovascular hypertension, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2010, **382**, 293-301.
- 18 F. Perez-Vizcaino and J. Duarte, Flavonols and cardiovascular disease, *Mol. Aspects Med.*, 2010, **31**, 478-94.
- 19 F. Perez-Vizcaino, J. Duarte, R. Jimenez, C. Santos-Buelga and A. Osuna. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin, *Pharmacol. Rep.*, 2009, **61**, 67-75.
- 20 S. Benito, D. Lopez, M. P. Sáiz, S. Buxaderas, J. Sánchez, P. Puig-Parellada and M. T. Mitjavila, A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta, *Br. J. Pharmacol.*, 2002, **135**, 910-6.
- 21 T. Jalili, J. Carlstrom, S. Kim, D. Freeman, H. Jin, T. C. Wu, S. E. Litwin and J. David Symons, Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006, **47**, 531-41.
- 22 J. Carlstrom, J. D. Symons, T. C. Wu, R. S. Bruno, S. E. Litwin and T. Jalili, A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats, *J. Nutr.*, 2007, **137**, 628-33.
- 23 M. Romero, R. Jiménez, B. Hurtado, J. M. Moreno, I. Rodríguez-Gómez, R. López-Sepúlveda, A. Zarzuelo, F. Pérez-Vizcaino, J. Tamargo, F. Vargas and J. Duarte, Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, **627**, 242-50.
- 24 Y. Kawai, S. Saito, T. Nishikawa, A. Ishisaka, K. Murota and J. Terao, Different profiles of quercetin metabolites in rat plasma: comparison of two administration methods, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009, **73**, 517-23.

- 25 R. Jiménez, R. López-Sepúlveda, M. Kadmiri, M. Romero, R. Vera, M. Sánchez, F. Vargas, F. O'Valle, A. Zarzuelo, M. Dueñas, C. Santos-Buelga and J. Duarte, Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase, *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, **43**, 462-73.
- 26 M. J. Mulvany and W. Halpern, Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats, *Circ. Res.*, 1977, **41**, 19–26.
- 27 F. Lodi, A. Cogolludo, J. Duarte, L. Moreno, A. Coviello, M. Peral De Bruno, R. Vera, M. Galisteo, R. Jiménez, J. Tamargo and F. Perez-Vizcaino, Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, **544**, 97-103.
- 28 S. Egert, A. Bosy-Westphal, J. Seiberl, C. Kürbitz, U. Settler, S. Plachta-Danielzik, A. E. Wagner, J. Frank, J. Schrezenmeir, G. Rimbach, S. Wolfram and M. J. Müller, Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study, *Br. J. Nutr.*, 2009, **102**, 1065-74.
- 29 G. Lukas, S. D. Brindle and P. Greengard, The route of absorption of intraperitoneally administered compounds, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1971, **178**, 562-4.
- 30 E. M. Hein, K. Rose, G. van't Slot, A. W. Friedrich and H. U. Humpf, Deconjugation and degradation of flavonol glycosides by pig cecal microbiota characterized by Fluorescence in situ hybridization (FISH), *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 2281-90.
- 31 S. Barnes, J. Prasain, T. D'Alessandro, A. Arabshahi, N. Botting, M. A. Lila, G. Jackson, E. M. Janle and C. M. Weaver, The metabolism and analysis of isoflavones

- and other dietary polyphenols in foods and biological systems, *Food Funct.*, 2011, **2**, 235-44.
- 32 V. Crespy, C. Morand, C. Besson, N. Cotelle, H. Vézin, C. Demigné and C. Rémésy, The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2003, **284**, G980-8.
- 33 B. A. Graf, C. Ameho, G. G. Dolnikowski, P. E. Milbury, C. Y. Chen and J. B. Blumberg, Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin, *J. Nutr.*, 2006, **136**, 39-44.
- 34 K. A. O'Leary, A. J. Day, P. W. Needs, F. A. Mellon, N. M. O'Brien and G. Williamson, Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 479-91.
- 35 C. Menéndez, M. Dueñas, P. Galindo, S. González-Manzano, R. Jiménez, L. Moreno, M. J. Zarzuelo, I. Rodríguez-Gómez, J. Duarte, C. Santos-Buelga and F. Pérez-Vizcaino, Vascular deconjugation of quercetin glucuronide. The flavonoid paradox revealed?, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **55**, 1780-90.
- 36 P. Galindo, I. Rodriguez-Gómez, S. González-Manzano, M. Dueñas, R. Jiménez, C. Menéndez, F. Vargas, J. Tamargo, C. Santos-Buelga, F. Pérez-Vizcaíno and J. Duarte, Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation, *Plos One* (in press).
- 37 S. Grunfeld, C. A. Hamilton, S. Mesaros, S. W. McClain, A. F. Dominiczak, D. F. Bohr and T. Malinski, Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats, *Hypertension*, 1995, **26**, 854-7.

- 38 H. Suzuki, A. Swei, B. W. Zweifach and G. W. Schmid-Schönbein, In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography, *Hypertension*, 1995, **25**, 1083-9.
- 39 M. Jameson, F. X. Dai, T. Lüscher, J. Skopec, A. Diederich and D. Diederich. Endothelium-derived contracting factors in resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats before development of overt hypertension, *Hypertension*, 1993, **21**, 280-8.
- 40 K. Wingler, S. Wünsch, R. Kreutz, L. Rothermund, M. Paul and H. H. Schmidt, Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **31**, 1456-64.
- 41 S. Wind, K. Beuerlein, M.E. Armitage, A. Taye, A.H. Kumar, D. Janowitz, C. Neff, A.M. Shah, K. Wingler and H.H. Schmidt, Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition, *Hypertension*, 2010, **56**, 490-7.
- 42 A. M. Briones, F. Tabet, G. E. Callera, A. C. Montezano, A. Yogi, Y. He, M. T. Quinn, M. Salaiques, R. M. Touyz, Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR, *J. Am. Soc. Hypertens.*, 2011, **5**, 137-53.
- 43 C. A. Hamilton, M. J. Brosnan, S. Al-Benna, G. Berg and A. F. Dominiczak, NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels, *Hypertension*, 2002, **40**, 755-62.
- 44 A. Machha and M. R. Mustafa, Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2005, **46**, 36-40.

- 45 M. Ajay, F. I. Achike, A.M. Mustafa and M. R. Mustafa, Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2006, **33**, 345-50.
- 46 C. Manach, C. Morand, V. Crespy, C. Demigné, O. Texier, F. Régéat and C. Rémésy, Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties, *FEBS Lett.*, 1998, **426**, 331-6.
- 47 S. P. Boyle, V. L. Dobson, S. J. Duthie, D. C. Hinselwood, J. A. Kyle and A. R. Collins, Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2000, **54**, 774-82.
- 48 F. Lodi, R. Jimenez, L. Moreno, P. A. Kroon, P. W. Needs, D. A. Hughes, C. Santos-Buelga, A. Gonzalez-Paramas, A. Cogolludo, R. Lopez-Sepulveda, J. Duarte and F. Perez-Vizcaino, Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta, *Atherosclerosis*, 2009, **204**, 34-9.
- 49 J. van Duynhoven, E. E. Vaughan, D. M. Jacobs, R. A. Kemperman, E. J. van Velzen, G. Gross, L. C. Roger, S. Possemiers, A. K. Smilde, J. Doré, J. A. Westerhuis and T. Van de Wiele, Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 4531-8.



## Figure Legends

**Figure 1.** Effects of quercetin (10 mg/kg) on arterial blood pressure in spontaneous hypertensive rats. Graph represents the time course of the systolic arterial pressure (A) and heart rate (B) as measured by tail-cuff plethysmography in the SHR vehicle (Control, n = 9), quercetin 1 oral dose/day (Q1Od, n = 10), quercetin 2 oral doses/day (Q2Od, n = 9) and quercetin 1 i.p. dose/day (Q1IPd, n = 9) groups. Values are expressed as means  $\pm$  s.e. mean. \*\* P < 0.01 vs SHR Control group. # P < 0.05 vs Q1IPd group.

**Figure 2.** Effects in heart (A) and kidney (B) indices in the SHR vehicle (Cont, n = 9), quercetin 1 oral dose/day (Q1Od, n = 10), quercetin 2 oral doses/day (Q2Od, n = 9) and quercetin 1 i.p. dose/day (Q1IPd, n = 9) groups. Values are expressed as means  $\pm$  s.e. mean. \* P < 0.05 vs Cont group.

**Figure 3.** Contractile responses in mesenteric arteries to phenylephrine (A) and KCl 125 mM from SHR vehicle (Cont, n = 9), quercetin 1 oral dose/day (Q1Od, n = 10), quercetin 2 oral doses/day (Q2Od, n = 9) and quercetin 1 i.p. dose/day (Q1IPd, n = 9) groups. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean. \* P < 0.05 vs SHR Cont group.

**Figure 4.** Effects of quercetin on endothelial function. Vascular relaxant responses induced by acetylcholine (ACh, A) in endothelium-intact and sodium nitroprusside (SNP, B) in endothelium-denuded aortae pre-contracted by 1 $\mu$ M phenylephrine (Phe) from SHR vehicle (Cont, n = 9), quercetin 1 oral dose/day (Q1Od, n = 10), quercetin 2 oral doses/day (Q2Od, n = 9) and quercetin 1 i.p. dose/day (Q1IPd, n = 9) groups. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean. \* P < 0.05 vs SHR Cont group. # P < 0.05 vs Q1IPd group.

**Figure 5.** Effects of quercetin in vascular NADPH oxidase. NADPH oxidase activity measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence (A) and p47<sup>phox</sup> (B), p22<sup>phox</sup> (C), NOX1 (D), and NOX4 (E) expression measured by western blot in aortic rings from SHR vehicle (Cont, n = 9), quercetin 1 oral dose/day (Q1Od, n = 10), quercetin 2 oral doses/day (Q2Od, n = 9) and quercetin 1 i.p. dose/day (Q1IPd, n = 9) groups. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean. \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 vs SHR Cont group.

**Figure 6.** HPLC chromatograms recorded at 370 nm of plasma samples collected 2 (left) and 8 hours (right) after administration of quercetin (10 mg/kg) to SHR, either orally (Q1Od) and intraperitoneally (Q1IPd), compared to the control group. Only the section of the chromatograms where the peaks corresponding to quercetin metabolites elute is shown.

**Table 1.** pD<sub>2</sub> and E<sub>max</sub> values of the contractile responses to phenylephrine in mesenteric arteries from all experimental groups calculated from data in Figure 3A.

| <b>Groups</b>  | <b>pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>)</b> | <b>E<sub>max</sub> (mN)</b> |
|----------------|--|-----------------------------|
| <b>Control</b> | 5.60 ± 0.09                                  | 25.1 ± 2.0                  |
| <b>Q1Od</b>    | 5.56 ± 0.05                                  | 19.6 ± 2.1*                 |
| <b>Q2Od</b>    | 5.54 ± 0.04                                  | 19.7 ± 2.1*                 |
| <b>Q1IPd</b>   | 5.67 ± 0.10                                  | 22.7 ± 2.8                  |

SHR vehicle (Cont, n = 9), quercetin 1 oral dose/day (Q1Od, n = 10), quercetin 2 oral doses/day (Q2Od, n = 9) and quercetin 1 i.p. dose/day (Q1IPd, n = 9) groups. Data are expressed as mean ± s.e. mean. \* P < 0.05 vs SHR Cont group.

**Table 2.** Quercetin metabolites detected in plasma of rats 2 and 8 hours after the administration of quercetin (10 mg/kg).

| <b>Assay</b>           | <b>Metabolites<br/>(tentative identity)</b> | <b>Concentration<br/>at 2 h (µM)</b> | <b>Concentration<br/>at 8 h (µM)</b> |
|------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Control</b>         | N.D.  |                                      |                                      |
| <b>Oral</b>            | Quercetin diglucuronide                     | 0.08                                 |                                      |
|                        | Methylquercetin<br>glucuronide 1            |                                      | 0.6415                               |
|                        | Methyl quercetin 1                          | 0.40                                 | Tr                                   |
|                        | Methylquercetin 2                           |                                      | Tr                                   |
|                        | Methylquercetin sulfate                     |                                      | Tr                                   |
| <b>Intraperitoneal</b> | Methylquercetin<br>glucuronide 1            | 2.26                                 | 2.82                                 |
|                        | Methylquercetin<br>glucuronide 2            |                                      | 1.02                                 |
|                        | Methylquercetin<br>glucuronide 3            |                                      | 0.54                                 |
|                        | Methylquercetin sulfate                     |                                      | 0.14                                 |
|                        | Methylquercetin 2                           |                                      | 0.17                                 |

Tr: compound detected but not in sufficient amounts for routine quantification

*Discusión*

---



Estudios epidemiológicos prospectivos han demostrado la existencia de una correlación inversa entre la ingesta de flavonoides en la dieta y la mortalidad por enfermedad coronaria. Los flavonoides se consumen regularmente, puesto que están presentes en frutas, verduras, semillas y productos derivados, tales como el vino tinto, el té y el chocolate. Debido a su distribución tan ubicua, flavonoides de diferentes clases, como la quercetina (el flavonol más consumido) y la catequina (el flavanol más importante conjuntamente con la epicatequina) están presentes juntos en los mismos alimentos y se consumen en la misma comida. Sin embargo, en pocas ocasiones se ha estudiado la existencia de posibles interacciones entre ellos, que puedan contribuir a explicar sus efectos protectores cardiovasculares.

Las células endoteliales, las células de músculo liso y las plaquetas son tres de las principales dianas de acción de los flavonoides, en lo que respecta a las enfermedades cardiovasculares. Los trabajos de Pignatelli y colaboradores (Pignatelli *et al.*, 2000; Pignatelli *et al.*, 2006), describiendo una acción sinérgica entre catequina y quercetina para la inhibición de la agregación plaquetaria, y el estudio de Cirico y Omaye (Cirico y Omaye, 2006), en el que se describen efectos sinérgicos de mezclas de polifenoles (incluyendo catequina, quercetina, hesperidina y ácido ferúlico) en la prevención de la oxidación de LDL, son las únicas referencias encontradas en la literatura en relación con las interacción entre polifenoles y el riesgo de enfermedad cardiovascular.

### **1. Ausencia de interacción sinérgica entre quercetina y catequina en el músculo liso vascular sistémico y pulmonar**

El primer estudio de esta Tesis Doctoral se dirigió a analizar una posible interacción entre estos dos flavonoides en el efecto vasodilatador independiente del endotelio, en la mejora de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo y en el

efecto pro-oxidante de estos compuestos. En él se ha demostrado que, en comparación con la quercetina, la catequina posee un leve efecto vasodilatador en arterias de conductancia y de resistencia, una baja capacidad para modular la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo y la ausencia de efectos pro-oxidantes. Además, es muy importante resaltar que la catequina no interfiere en los efectos producidos por la quercetina, respecto a todos estos parámetros, mostrando así *la ausencia de interacción entre ambos flavonoides*.

### **a) Efecto sobre el tono vascular**

El efecto vasodilatador directo independiente del endotelio producido por los flavonoles es uno de los posibles mecanismos implicados en sus efectos antihipertensivos, los cuales podrían también contribuir a la prevención de otras formas de enfermedades cardiovasculares como son la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares. En este estudio se ha encontrado que la quercetina es un vasodilatador más potente en las pequeñas arterias, que son las que intervienen en el control de las resistencias vasculares periféricas y por ello, las que regulan el flujo sanguíneo hacia los tejidos y la presión arterial, que en las arterias de conductancia (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002).

Recientemente, la presión arterial pulmonar ha sido considerada como un factor de riesgo cardiovascular (Lam *et al.*, 2009). De ahí que nosotros estudiáramos también, por primera vez, los posibles efectos relajantes de la quercetina sobre las arterias pulmonares de resistencia. Se ha encontrado que la potencia vasodilatadora de la quercetina en este lecho vascular es mayor que en la aorta, pero menor que en las arterias de resistencia sistémicas (mesentéricas), lo que indica una baja selectividad por la circulación pulmonar. Sin embargo, la catequina presentó un efecto vasodilatador muy leve en todas las arterias estudiadas.



Por otra parte, la catequina no modificó los efectos vasodilatadores de la quercetina en ninguno de los tres tipos de vasos estudiados. Respecto a la aorta, el análisis isobolográfico reveló que los efectos de ambos flavonoides son aditivos, puesto que los puntos de sus combinaciones se representan cerca de la línea de aditividad (incluidos los puntos del error estándar medio). En las arterias mesentéricas y pulmonares, el isoblograma no pudo ser realizado debido al efecto tan leve de la catequina. Sin embargo, los datos sugieren que *no existe interacción*.

### **b) Efecto sobre la disfunción endotelial**

La disfunción endotelial es un marcador precoz, independiente y de mal pronóstico en la mayoría de las formas de enfermedad cardiovascular. Uno de los principales mecanismos que provocan la disfunción endotelial es la producción vascular de ROS, concretamente el  $O_2^-$  producido por la NAD(P)H oxidasa reacciona rápidamente con el NO e induce su inactivación.

La quercetina restaura el deterioro de la función endotelial *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2007, Romero *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2010b) e *in vivo* en diversos modelos animales de hipertensión (Sánchez *et al.*, 2006), a través de por lo menos dos mecanismos: (i) de forma aguda, la quercetina capta directamente al  $O_2^-$  e inhibe la actividad de las enzimas generadoras de este anión; (ii) de forma crónica, puede prevenir la expresión de genes implicados en la generación de  $O_2^-$  como son las subunidades de la NAD(P)H oxidasa, inducidas por estímulos patológicos como la ET-1 o la Ang-II.

En nuestro primer estudio, empleamos un protocolo que induce de forma aguda la disfunción endotelial basada únicamente en un incremento del estrés oxidativo, al impedir la degradación del  $O_2^-$  endógeno, mediante la inhibición de la SOD con

DETCA. La catequina a concentraciones fisiológicamente relevantes (10  $\mu\text{M}$ ) tuvo un efecto protector leve en el deterioro de la relajación a ACh provocada por el DETCA. La combinación de catequina y quercetina (ambos a 5  $\mu\text{M}$ ) producen una protección menos efectiva que la quercetina a 10  $\mu\text{M}$ , *descartando una interacción sinérgica entre los dos compuestos.*

### **c) Efecto pro-oxidante**

Los antioxidantes también muestran a menudo efectos pro-oxidantes, cuando se analizan en determinadas condiciones experimentales. Así, los flavonoides, como antioxidantes naturales, también presentan efectos pro-oxidantes (la llamada “paradoja de la quercetina”, Boots *et al.*, 2007) (López-López *et al.*, 2004; Halliwell, 2008), los cuales pueden estar involucrados en algunas de sus propiedades biológicas. Bajo ciertas condiciones experimentales, la generación de  $\text{O}_2^-$  por parte de la quercetina puede captar al NO y por lo tanto, reducir la vasodilatación inducida por el NO (López-López *et al.*, 2004). Además, en la activación de los  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  inducida por quercetina se ha implicado la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y este mecanismo contribuye, al menos parcialmente, a su efecto vasodilatador coronario (Cogolludo *et al.*, 2007). La quercetina se auto-oxida y genera  $\text{O}_2^-$  que reacciona rápidamente con el NO (López-López *et al.*, 2004). En contra, la catequina (10  $\mu\text{M}$ ) carece de este efecto scavenger sobre el NO. Los efectos de la quercetina sobre el NO pueden ser impedidos por otros captadores de  $\text{O}_2^-$  como la SOD, por lo que cabría esperar que la catequina previniera estos efectos de la quercetina, a través de un efecto antioxidante. Sin embargo, al menos con la concentración empleada (10  $\mu\text{M}$ ), *la catequina no previno la auto-oxidación de la quercetina ni el efecto captador sobre el NO.*

Las ROS intracelulares pueden ser detectadas mediante el empleo de sondas fluorescentes como el dihidroetidio (DHE), que detecta  $\text{O}_2^-$ , o la diclorofluoresceína,

que detecta principalmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Confirmando uno de nuestros trabajos previos, usando diclorofluoresceína en arterias coronarias (Cogolludo *et al.*, 2007), aquí también encontramos que la quercetina incrementa las ROS intracelulares en el músculo liso de aorta. Por contra, la catequina presentó un efecto escavenger débil sobre el NO en los sistemas libres de células y no incrementó significativamente el O<sub>2</sub><sup>-</sup> intracelular en las CMLV. Además, *la catequina tampoco impidió el efecto pro-oxidante de la quercetina*, ya sea en los sistemas libre de células o en los cultivos de CMLV.

Por lo que podríamos concluir que este primer trabajo *in vitro* demuestra que la catequina tiene efectos débiles sobre la función vascular de forma aguda, y que cuando está presente junto con la quercetina, sus efectos son aditivos, excluyendo interacciones sinérgicas de estos dos flavonoides.

Una limitación del primer estudio de esta Tesis Doctoral es que el rango de concentraciones plasmáticas de quercetina encontrados en seres humanos que consumen alimentos ricos en flavonoides es de 0,3-7,6 µM (Manach *et al.*, 2005), que está por debajo del rango de concentraciones efectivas empleadas en nuestro estudio (1 µM no tuvo casi ningún efecto y 10 µM tuvo un efecto inhibitor casi completo en el tejido vascular mesentérico). Además la quercetina está presente en el plasma mayoritariamente en forma de metabolitos glucuronizados y sulfatados (Manach *et al.*, 2005), los cuales carecen de efecto vasodilatador agudo (Lodi *et al.*, 2008). Sin embargo, existen evidencias recientes de que los glucurónidos se desconjugan y la quercetina libre (aglicón) se acumula en las células en concentraciones variables (Bieger *et al.*, 2008), aunque la relevancia biológica de este proceso es aún desconocida.

## 2. Desconjugación vascular de quercetina glucurónico: ¿la paradoja de los flavonoides revelada?

Actualmente, la validez de un gran número de estudios que analizan los efectos *in vitro* de la quercetina y de otros flavonoides, que no están presentes como formas libres en el plasma, ha sido cuestionada. Este hecho se basa en que los principales metabolitos de quercetina en el plasma humano (Q3GA, Q3'S y I3GA) o no producen efectos *in vitro* o si los originan son efectos mucho más débiles que los del compuesto de origen. Esto se puede considerar como “**la paradoja de los flavonoides**”, que referida a quercetina se puede enunciar como: “la quercetina oral ejerce efectos sistémicos biológicos demostrables, pero sus formas circulantes en plasma, después de la administración oral, poseen una débil actividad *in vitro*”. En una primera aproximación, en esta Tesis Doctoral hemos analizado los efectos *in vitro* del principal metabolito plasmático de quercetina, Q3GA, sobre el tono vascular, adicionado tanto de forma aguda como crónica.

Algunos estudios previos han demostrado que los glucurónidos de quercetina pueden ser desconjugados *in vitro* en cultivos de macrófagos (Kawai *et al.*, 2008) y en homogenizados de intestino delgado e hígado humanos (O'Leary *et al.*, 2001). En el plasma de cerdos alimentados con dietas suplementadas con quercetina, ésta es indetectable como aglicón, pero sí se encuentra en concentraciones relativamente altas en diferentes tejidos (Bieger *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que la actividad de los metabolitos de quercetina puede depender de su desconjugación *in situ*. Terao y colaboradores proponen que los glucurono-conjugados de quercetina actúan no sólo como metabolitos de detoxificación, sino también como precursores del aglicón hidrofóbico que es el responsable de la bioactividad (Terao *et al.*, 2011). Nosotros hemos estudiado esta hipótesis con la Q3GA en la pared vascular, en estudios *in vitro* e *in vivo*.

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que (i) la Q3GA puede desconjugarse enzimáticamente en un lecho vascular perfundido liberando la quercetina aglicón, que se acumula en el líquido de perfusión y dentro del tejido, (ii) la Q3GA es más estable que la quercetina libre en el lecho vascular, (iii) la Q3GA ejerce efectos inhibitorios sobre la contracción vascular *in vitro* cuando se incuba durante largos periodos de tiempo a través de la liberación del aglicón y (iv) la Q3GA ejerce un efecto reductor progresivo y de larga duración sobre la presión arterial *in vivo*. En conjunto, estos resultados sugieren que los glucurónidos de quercetina circulan por el torrente sanguíneo comportándose como transportadores de la quercetina, y parece ser la aglicona liberada en los tejidos diana, la efectora final.

#### **a) Metabolismo de quercetina en un lecho vascular aislado y perfundido**

La quercetina desapareció rápidamente del líquido recirculante, en parte por captación de dicha quercetina por parte del tejido. Sin embargo, *la aparición simultánea del ácido protocatéquico* en concentraciones elevadas en el líquido de perfusión indica la existencia de un metabolismo vascular de la quercetina, que puede explicar la mayor parte de la disminución en su concentración. Esto parece ser debido a una degradación oxidativa realizada por el tejido mediante peroxidación, con la consiguiente apertura del anillo C, lo que conduce a la formación del ácido carboxílico (Boulton *et al.*, 1999). Debido a la alta polaridad del ácido protocatéquico, éste se mantuvo en el líquido de perfusión y no se llegó a detectar en el tejido. A pesar de la rápida descomposición de la quercetina en el líquido de perfundido, ésta sí que estaba presente en el tejido tras largos periodos de incubación (3 y 6 horas), lo que sugiere que se acumula en algún compartimento en el que está parcialmente protegida de su degradación. Además de la quercetina, en el tejido también se encontraron pequeñas cantidades de metilquercetina, pero no de metabolitos glucuronizados.

La Q3GA fue más estable en el líquido de circulación que la quercetina. La lenta disminución en la concentración de la Q3GA fue acompañada por un aumento paralelo en la de quercetina, lo que nos sugirió que la desconjugación era la principal vía metabólica de la Q3GA. Esta hipótesis también se sustentó en el fuerte efecto reductor del metabolismo de la Q3GA inducido por el inhibidor selectivo de  $\beta$ -glucuronidasas (SAL). De forma opuesta a este modelo *in vitro* en el que la quercetina libre se acumula lentamente en el líquido de perfusión, la quercetina en plasma está casi ausente en los experimentos *in vivo*, probablemente debido a que es rápidamente re-glucuronizada en el hígado (Day *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2009). Además, la quercetina se acumula en el tejido, lo que también fue impedido al emplear el SAL. Asimismo, las concentraciones de quercetina libre en el tejido continuaron aumentando desde las 3 a las 6 horas después de la administración de la Q3GA, mientras que disminuyó durante este intervalo de tiempo cuando fue la aglicona la que se perfundió. Un hallazgo interesante de este estudio es que la quercetina derivada de la desconjugación de la Q3GA no se metaboliza a ácido protocatéquico. Todos estos datos apoyan la hipótesis sobre que la Q3GA circulante actúa como un “almacén estable” de quercetina, la cual se iría liberando lentamente y evitaría así su rápida degradación.

### **b) Efecto de la Q3GA sobre el tono vascular**

Los efectos vasodilatadores de la quercetina y sus metabolitos relacionados han sido ampliamente evaluados *in vitro* (Duarte *et al.*, 1993; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002). Recientemente también hemos demostrado que los metabolitos conjugados de quercetina (Q3GA, Q3'S e I3GA) no tienen efecto vasodilatador directo en la aorta aislada de rata (Lodi *et al.*, 2009) o en las arterias mesentéricas (sin publicar), ya sea en arterias con o sin endotelio. En esta Tesis hemos encontrado que, cuando se incubó la Q3GA durante 30 minutos en el baño de órganos, también es inefectiva. Sin embargo,

---

cuando la incubación se prolonga en el tiempo, sí se produce un efecto inhibitorio progresivo sobre la contracción vascular de forma concentración y tiempo dependiente, y además, se puede decir que este efecto es independiente del endotelio y del NO. Estos resultados sugieren que la desconjugación de la Q3GA es requerida para que aparezca su efecto biológico. De hecho, el inhibidor de  $\beta$ -glucuronidasa previno el efecto producido por la Q3GA. Por lo tanto, *estos resultados proporcionan la primera evidencia que relaciona la desconjugación vascular con la actividad biológica.*

Una cuestión importante, a fin de correlacionar las concentraciones de quercetina con su efecto biológico, es si sus efectos vasodilatadores son reversibles o no. A pesar de que un gran número de trabajos han demostrado el efecto vasodilatador *in vitro* de la quercetina, a nuestro entender ninguno de ellos han observado su posible reversibilidad tras su lavado. Aquí, hemos demostrado que una vez que se elimina la quercetina del medio, el efecto contráctil está casi recuperado por completo a los 60 minutos.

También quisimos estudiar, los posibles efectos vasodilatadores de la Q3GA *in vivo*. Este glucurónido administrado por vía iv, que sería como se encontraría tras la administración oral de quercetina, produjo una disminución en la presión arterial, siendo ésta *la primera demostración de que la Q3GA ejerce efectos in vivo*. Este efecto reductor sobre la presión arterial es lento en su inicio pero continúa de forma progresiva, lo que está de acuerdo con los datos *in vitro* y también con nuestra hipótesis de que se requiere su metabolismo para ejercer su efecto biológico. Recientemente se ha planteado una interesante hipótesis acerca de que los polifenoles son metabolizados por la microbiota residente en el colon y son estos metabolitos los que entran en la circulación sistémica y por tanto, los responsables de los efectos *in vivo* (van Duynhoven *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros datos muestran que el efecto del flavonoide quercetina, cuando se administra por vía oral, se puede explicar, al menos en parte, por el metabolito glucuronizado producido en intestino e hígado. Ambos

mecanismos no son excluyentes y pueden, por tanto, contribuir a los efectos biológicos asociados a la ingesta de flavonoides en la dieta.

Estos resultados nos permiten concluir que la Q3GA es desconjugada en la pared vascular, ejerce efectos inhibidores sobre la contractilidad vascular a largo plazo debido a la liberación del aglicón e induce efectos reductores sobre la presión arterial. Por ello, proponemos que la quercetina, y posiblemente otros flavonoides relacionados, cuando se consume por vía oral es rápidamente metabolizada en el intestino y en el hígado en derivados glucuronizados que actúan como vehículos de quercetina y liberan el aglicón libre *in situ* por desconjugación, que es el responsable final del efecto biológico.

En esta Tesis Doctoral también hemos estudiado los efectos *in vivo* sobre la presión arterial en SHRs de los principales metabolitos de quercetina encontrados en el plasma humano, y el papel de la desconjugación a través de enzimas glucuronidasas en esta respuesta biológica. Además, hemos estudiado si la desconjugación es requerida para que la quercetina ejerza su efecto antihipertensor, cuando es administrada por vía oral.

### **3. La Q3GA disminuye la presión arterial en SHR por desconjugación**

En este estudio hemos demostrado que no sólo el metabolito glucuronizado Q3GA produce efectos antihipertensivos en SHRs cuando se administra por vía iv, sino que también los produce la I3GA, pero no la Q3'S. Como se ha descrito anteriormente la Q3GA no tiene efectos vasculares agudos *in vitro* (a 30 min), sin embargo aparecen efectos significativos con incubaciones más prolongadas. Tanto los efectos *in vivo* como *in vitro* se previenen por inhibición de las enzimas  $\beta$ -glucuronidasas. Estos datos



sugieren que se requiere la desconjugación para que se observen los efectos de los metabolitos de quercetina. Por otra parte, la quercetina oral redujo la presión arterial en casi un 30% en SHR, siendo este efecto persistente al menos durante 6 horas. Además, también este efecto desapareció al emplear el inhibidor SAL, lo que nos indica que *la conjugación realizada en hígado-intestino y su posterior desconjugación local (tejido vascular) son procesos que se requieren para el efecto antihipertensivo de la quercetina.*

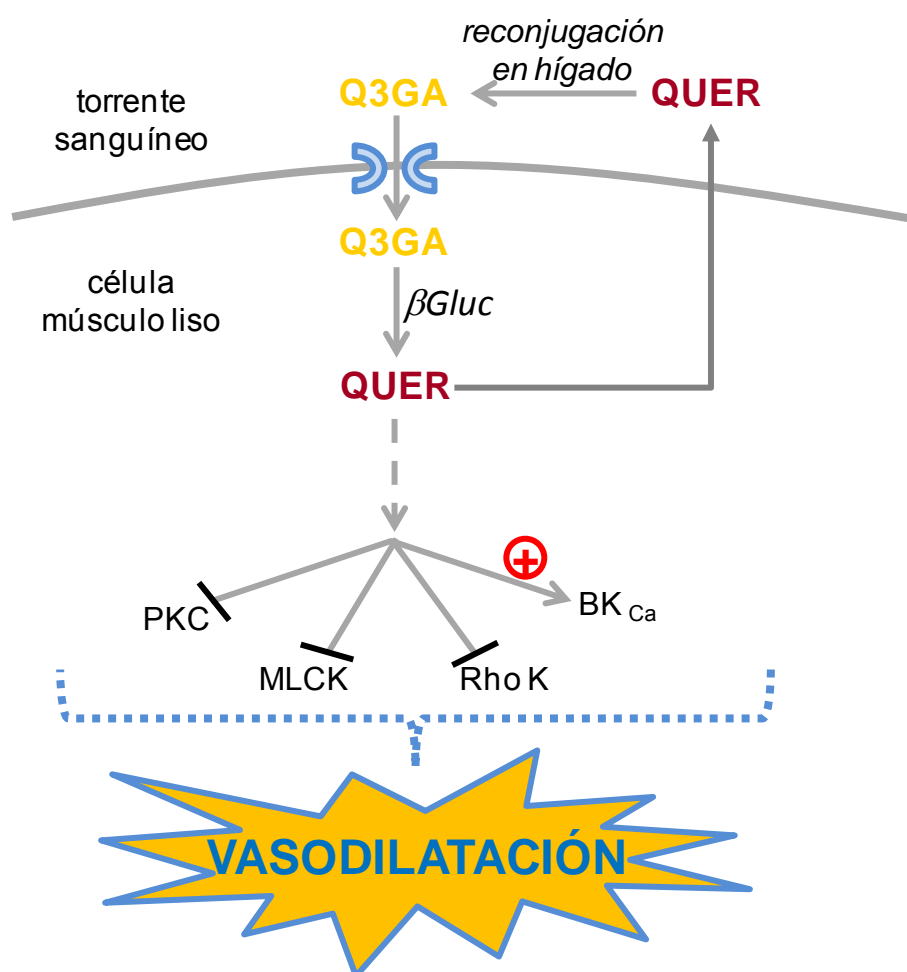
### **a) Efecto antihipertensor agudo de los metabolitos plasmáticos de quercetina**

Tanto los tejidos humanos como los de rata, con excepción de las células que recubren el tracto gastrointestinal, están expuestos a la quercetina a través del torrente sanguíneo. Sin embargo, las formas libres de quercetina y de su metabolito metilado, isoramnetina, no se han detectado en plasma, lo cual plantea la cuestión de cuál o cuáles son los compuestos responsables de la actividad antihipertensiva. Dado que los compuestos sulfatados y glucuronizados son los únicos metabolitos detectados en el plasma humano, se ha sugerido que estos deben desempeñar un papel decisivo en los posibles efectos beneficiosos (Manach *et al.*, 1999). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, puesto que hemos demostrado que tanto la Q3GA como la I3GA, principales metabolitos plasmáticos humanos de quercetina, ejercen un efecto antihipertensivo. Además, éste es un efecto dosis dependiente puesto que dosis tan bajas como 0,02 mg/kg de Q3GA también produjeron una disminución significativa de la PAM en SHR. Trabajos publicados anteriormente por otros grupos (Manach *et al.*, 1998; Scalber y Williamson, 2000; Day *et al.*, 2001; Kroon *et al.*, 2004; Mullen *et al.*, 2006), demuestran que las concentraciones de los metilados de quercetina están en la misma o en mayor proporción que los no metilados, en humanos y ratas tratadas con dietas

suplementadas con quercetina, lo que sugiere que ambas formas pueden contribuir al efecto antihipertensivo.

Cuando analizamos la evolución temporal del efecto antihipertensivo y la comparamos con las concentraciones plasmáticas de Q3GA, nos encontramos con una clara disociación. En nuestras condiciones experimentales, *la dosis de 1 mg/kg por vía iv de Q3GA proporcionó una concentración plasmática máxima de ~ 25 µM tras 10 minutos*, que es mayor que el previamente publicado por el grupo de investigación de da Silva de 9,6 µM tras 6 horas de la administración de 10 mg/kg de quercetina a través de una sonda gástrica (da Silva *et al.*, 1998). Sin embargo, la Q3GA desapareció rápidamente del plasma, lo que indica que los dos modos de administración resultaron en dos perfiles farmacocinéticos completamente diferentes. Esta disminución tan rápida en la concentración plasmática de Q3GA no es compatible con la excreción renal, lo que sugiere que la Q3GA se metaboliza, se acumula en los tejidos o ambas cosas a la vez. Como ya hemos visto anteriormente en esta Tesis Doctoral, la perfusión de Q3GA a través del lecho vascular mesentérico de rata resultó en una acumulación parcial de quercetina libre en el tejido, tras un proceso progresivo de desconjugación. La aglicona resultante se encuentra principalmente retenida en el interior celular y una pequeña parte en el líquido extracelular. Además, la utilización del inhibidor de β-glucuronidasas SAL aumentó la concentración de Q3GA en el tejido y redujo la de genina libre. Esta desconjugación se prevé que se produzca intracelularmente puesto que estas enzimas se encuentran en los lisosomas y la fracción microsomal. Por lo tanto, la aglicona se va a formar dentro de las vesículas y, probablemente en el citosol de las células de la musculatura lisa, donde es de esperar que interactuara con sus dianas para producir la relajación del músculo liso vascular (figura 12). Las dianas más probables para este efecto son las proteínas quinasas involucradas en la regulación de la interacción miosina-actina, incluyendo la PKC, la MLCK o la Rho quinasa y posiblemente también los canales de K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) (Duarte *et al.*, 1994; Duarte *et al.*, 2001; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002; Cogolludo *et al.*, 2007) (figura 12). La quercetina libre que es expulsada al

plasma, probablemente, sea rápidamente reconjugada en el hígado, y eso explicaría sus bajos niveles plasmáticos.



**Figura 12.** Formación de la quercetina (QUER) aglicona a partir de su metabolito glucuronizado Q3GA por acción de las enzimas  $\beta$ -glucuronidasas ( $\beta$ Gluc) en las células del músculo liso y sus posibles mecanismos involucrados en la producción de la vasodilatación vascular. PKC, proteína quinasa C; MLCK, quinasa de cadenas ligeras de miosina; Rho K, quinasa Rho; BK<sub>Ca</sub>, canales de K<sup>+</sup> activados por calcio de conductancia larga.

Los efectos vasodilatadores de la quercetina y sus metabolitos han sido ampliamente evaluados *in vitro* en aorta y en lecho mesentérico perfundido (Duarte *et al.*, 1993; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002; Khoo *et al.*, 2010). En SHRs, el incremento en la

presión arterial se relaciona con el aumento en la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica en las arterias mesentéricas de pequeño calibre (Nyborg y Bevan, 1988; Nomura y Asano, 2002). Como era de esperar, tanto la quercetina como la isoramnetina, al ser incubadas durante 30 minutos, inhibieron la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (Phe, *phenylephrine*), agonista de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. En las mismas condiciones experimentales, la Q3GA no modificó esta respuesta (como se expuso en el apartado anterior). Estos resultados coinciden con datos publicados anteriormente que demuestran que la conjugación de los flavonoides resulta en una disminución de la actividad biológica (Moon *et al.*, 2001; Lolito y Frei, 2006). Sin embargo, cuando las arterias mesentéricas pequeñas fueron incubadas durante 1 y 2 horas con Q3GA (25  $\mu$ M), la vasoconstricción inducida por Phe se redujo significativamente, lo que sugiere que la quercetina se acumula en el lecho vascular y es la responsable de la reducción en el tono vascular. Un escenario similar ha sido descrito anteriormente, donde los metabolitos de la quercetina del torrente circulatorio podían penetrar a través de las células endoteliales dañadas/activadas e interactuar con las células de la capa subíntima, tales como los macrófagos y las células del músculo liso (Mochizuki *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2008). *La desconjugación de los metabolitos glucuronizados de los flavonoides por un incremento en la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en el lugar de la inflamación*, se ha sugerido como un posible mecanismo involucrado en los efectos protectores de los flavonoides *in vivo* (O'Leary *et al.*, 2001; Shimoi *et al.*, 2001). Por ello, la liberación extracelular de  $\beta$ -glucuronidasas se considera un índice de integridad de la membrana lisosomal (Michihara *et al.*, 2005). De hecho, el lecho mesentérico de SHRs expresa enzimas  $\beta$ -glucuronidasas y su actividad se redujo significativamente por el SAL. Los tejidos vasculares de las SHRs muestran una mayor expresión de marcadores proinflamatorios, una función endotelial alterada y un aumento de la infiltración de macrófagos, si se comparan con los animales normotensos (WKY) (Sullivan *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008), lo que podría facilitar la acumulación de metabolitos y su posterior desconjugación *in situ* en estos tejidos inflamados. Además, el efecto

inhibitorio sobre la respuesta contráctil a Phe en las arterias mesentéricas inducido por la Q3GA también fue bloqueado por el SAL, demostrando que *la desconjugación de la Q3GA es requerida para ejercer también su efecto inhibidor*.

### **b) Participación de las glucuronidasas en el efecto antihipertensor de la quercetina oral**

Dado el papel de las  $\beta$ -glucuronidasas en los efectos de la Q3GA, quisimos analizar si también eran relevantes para el efecto antihipertensivo de la quercetina. Sorprendentemente, a pesar de todos los estudios crónicos que se han realizado con la quercetina, a nuestro entender, los efectos de la administración aguda de quercetina oral sobre la presión arterial en animales hipertensos no se habían estudiado aún. Encontramos que la quercetina produce un efecto antihipertensivo en SHR de evolución lenta, pero de larga duración (más de 6 horas). También estos efectos se suprimieron por la inhibición de las enzimas  $\beta$ -glucuronidasas con SAL. Sin embargo, como era de esperar, los efectos *in vitro* de la quercetina no se vieron afectados por dicha inhibición. Así, todos nuestros datos sugieren que *“la actividad biológica in vivo de la quercetina es dependiente de los procesos de conjugación/desconjugación”*. Aunque normalmente, la disminución en las glucuronizaciones resulta en un aumento de la actividad y/o toxicidad de los medicamentos, paradójicamente, la glucuronización parece ser necesaria para la actividad de la quercetina. Por lo tanto, esta glucuronización puede proteger a la quercetina de ser metabolizada por otras vías y ayudar a transportar a los flavonoides hacia los tejidos donde se liberaría la genina libre (Schewe *et al.*, 2008). Nuestros datos también sugieren que los polimorfismos en las enzimas UDP-glucuronosil transferasas (codificados por los locus UGT1 y UGT2), que son comunes en los seres humanos (Crettol *et al.*, 2010), y los cambios en la actividad de las  $\beta$ -glucuronidasas, podrían dar lugar a respuestas muy variables a la quercetina.

En conclusión, hemos demostrado que los glucurónidos de quercetina y de su metabolito metilado isoramnetina están implicados en la respuesta antihipertensiva de la quercetina oral, que podría estar relacionada, al menos en parte, con el efecto inhibidor de la hiperrespuesta contráctil  $\alpha$ -adrenérgica en arterias de resistencia de SHR. La quercetina podría ser inicialmente inactivada por un metabolismo de conjugación durante la absorción y luego ser liberada de forma segura en la pared vascular inflamada. Los metabolitos reclutados son incorporados y convertidos en aglicón libre en las CMLV, donde ejercen su actividad inhibitoria del tono vascular. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que los glucurónidos de los flavonoides parecen ser los transportadores plasmáticos de las geninas libres hacia las células diana, en lugar de sólo moléculas de excreción.

En último lugar quisimos analizar si la pauta de administración de la quercetina modificaba el perfil de biodisponibilidad y el metabolismo en SHR y así, determinar la correlación entre el perfil farmacocinético y la actividad sobre la función endotelial y la presión arterial.

#### **4. La quercetina origina diferentes efectos protectores cardiovasculares por vía oral o intraperitoneal en SHR**

En el último trabajo de esta Tesis Doctoral, hemos descrito por primera vez que la vía (oral vs intraperitoneal (ip)) de administración crónica de la quercetina altera sus efectos antihipertensivos en SHR, respecto a su desarrollo en el tiempo y su eficacia, y su efecto protector en los órganos diana, como son el corazón, los riñones y el endotelio, siendo más eficaz la administración oral que la ip. Sin embargo, los mayores niveles plasmáticos de metabolitos se cuantificaron en la administración ip en

comparación con la oral (en los 2 tiempos analizados), a excepción de la aglicona metilada de quercetina que se presentó en mayores cantidades plasmáticas tras la administración oral en comparación con la ip a 2 horas, pero no a las 8 horas. Estos datos confirman que *el método de liberación de la quercetina es un determinante crítico para el efecto biológico.*

### **a) Importancia de la pauta de administración de quercetina en su efecto antihipertensor crónico**

Hemos observado que bajo el mismo nivel de dosis de quercetina, la eficacia de una única administración (10 mg/kg) o dos de ellas (5 + 5 mg/kg en intervalos de 12 horas) administradas por vía oral es comparable; ambas pautas de dosificación redujeron de forma similar la presión arterial, la hipertrofia cardíaca y renal, y restauraron la deficiente vasodilatación dependiente del endotelio en la aorta de SHR. Aunque leves, *las diferencias favorecen a la administración única frente a las dos dosis diarias.*

Los ensayos clínicos realizados sobre los efectos antihipertensivos de la quercetina han usado una dosis única (150 mg) (Egert *et al.*, 2009) o dos dosis diarias (2 x 365 mg) (Edwards *et al.*, 2007), pero nunca han sido comparadas directamente. Si nuestros datos se pudieran extrapolar a seres humanos, una sola dosis diaria debería ser equivalente (incluso posiblemente mejor) que las dos dosis repetidas. Por lo que podemos especular que esto también tiene su relevancia nutricional, ya que sugiere que una sola comida rica en flavonoides al día podría ser suficiente para ofrecer protección cardiovascular.

Además de nuestro método de administración de la quercetina por vía oral a través de sonda gástrica, se han empleado otras maneras de consumo, incorporando la

quercetina directamente a la dieta y permitiendo su consumo *ad libitum*. Una dieta suplementada con quercetina incrementó la producción de NO en aortas de rata (Benito *et al.*, 2000) y redujo la presión arterial y la hipertrofia cardíaca en ratas con constricción aórtica (Jalili *et al.*, 2006). Sin embargo, Carlstrom y colaboradores no encontraron ningún efecto al emplear una dieta suplementada con quercetina en SHR (Carlstrom *et al.*, 2007), mientras que la administración oral de este flavonoide a través de sonda gástrica sí que fue eficaz en la prevención de complicaciones cardiovasculares en el mismo modelo de hipertensión animal (Duarte *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010a). Estos autores explican el diferente comportamiento debido a que tras la administración por sonda se alcanzan niveles plasmáticos mucho más altos que con la dieta suplementada con quercetina. Del mismo modo, Kawai y colaboradores encontraron que el perfil de los metabolitos en plasma y su capacidad antioxidante se veían afectados significativamente por el tipo de administración en ratas (Kawai *et al.*, 2009). Así, los extractos plasmáticos ricos en metabolitos conjugados procedentes del acceso libre a una dieta suplementada en quercetina fueron menos eficaces en cuanto a su capacidad antioxidante frente a la oxidación de LDL *in vitro*, que los procedentes del grupo administrado por vía oral mediante sonda gástrica (Kawai *et al.*, 2009).

### **b) Importancia de la vía de administración de quercetina en su efecto antihipertensor crónico**

En general, los compuestos administrados por vía *ip* son absorbidos principalmente a través de la circulación portal y, por tanto, deben pasar primero por el hígado, donde pueden ser metabolizados antes de llegar a otros órganos (Lukas *et al.*, 1971). Por el contrario, los compuestos administrados por vía oral están sujetos a un metabolismo y a una degradación por las enzimas de la microbiota de la luz gastrointestinal. Durante esta absorción intestinal, los compuestos están expuestos a un posible metabolismo en las células epiteliales antes de llegar a la circulación portal y

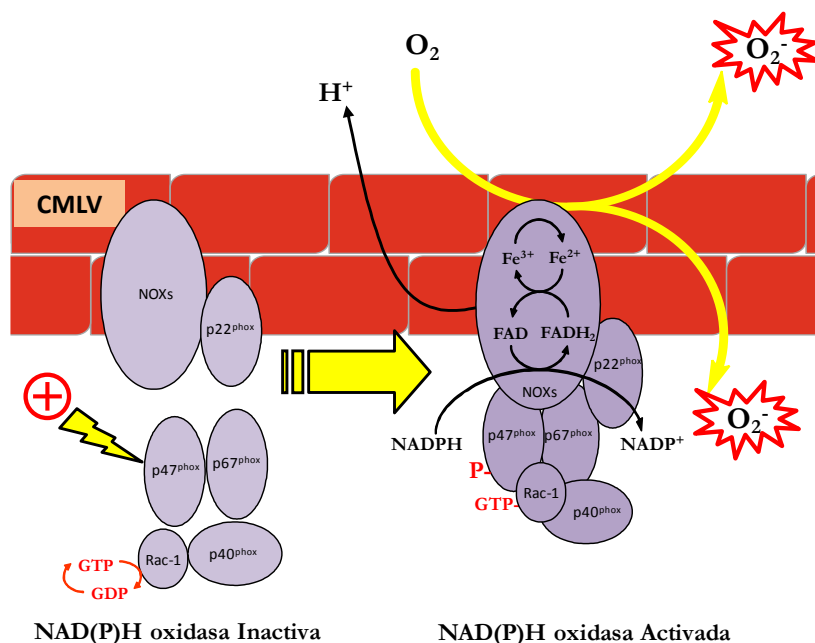


finalmente al hígado. Por lo tanto, el metabolismo hepático y periférico es común a ambas vías de administración, mientras que el metabolismo intestinal y el epitelial son exclusivos del tratamiento oral. Como regla general, se espera que la administración ip conduzca hacia una mayor biodisponibilidad del fármaco. Los glucósidos de quercetina son hidrolizados por la microbiota intestinal, liberando la genina, que puede ser degradada a polifenoles simples o a ácidos fenólicos (Hein *et al.*, 2008; Barnes *et al.*, 2011). Durante la absorción de la quercetina, ésta también puede ser conjugada en el tracto intestinal (Crespy *et al.*, 2003; Graf *et al.*, 2006). Finalmente, la quercetina o sus metabolitos son sustratos para el metabolismo hepático (metilación y conjugación con el ácido glucurónico y/o el ión sulfato) (O'Leary *et al.*, 2003) y para el posterior metabolismo en los tejidos periféricos (desconjugación y oxidación a ácidos fenólicos) (comentado en los anteriores apartados).

En nuestro estudio hemos observado como *la vía de administración es un factor determinante y crítico para la evolución temporal y la eficacia en la protección cardiovascular en SHRs*. De hecho, la administración ip crónica de quercetina también redujo la PAS, pero después de 3 semanas de tratamiento, y en este caso no estuvo acompañado por una mejora en la función endotelial ni por una protección de los órganos diana. Esta falta de efectos protectores en la morfología del corazón y los riñones, a pesar de la reducción que ejerce sobre la presión arterial sistólica al final del experimento (5 semanas), en comparación con el grupo control, puede ser explicado debido a que el tiempo haya sido insuficiente para revertir la hipertrofia de los órganos. La respuesta *ex vivo* a los vasoconstrictores (KCl y Phe) en las arterias mesentéricas también se vio reducida, pero sólo para las administraciones orales de quercetina en comparación con el grupo control y la administración ip.

Tanto en las arterias de SHRs como en las de pacientes con hipertensión esencial se ha descrito una mayor producción de  $O_2^-$  endotelial (Grunfeld *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995), y este efecto se ha relacionado con el deterioro en la relajación dependiente

del endotelio (Suzuki *et al.*, 1995). El complejo NAD(P)H oxidasa fue originalmente descrito en fagocitos, donde se compone de un núcleo catalítico unido a la membrana formado por la NOX2 (anteriormente denominado como gp91<sup>phox</sup>) y la p22<sup>phox</sup>, la proteína G pequeña Rap1A, y otras subunidades citoplasmáticas como son la p47<sup>phox</sup>, la p67<sup>phox</sup> y la p40<sup>phox</sup> (figura 13). Por lo menos, 3 de las NOXs de la NAD(P)H oxidasa, se expresan en la vasculatura de roedores (NOX1, NOX2 y NOX4) (Wingler *et al.*, 2001; Wind *et al.*, 2010), las cuales se sobreexpresan en SHRs (Briones *et al.*, 2011). La expresión de otras subunidades no catalíticas reguladoras están correlacionadas con la hipertensión, como por ejemplo es el caso de la p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>. La NAD(P)H oxidasa vascular no es sólo una fuente importante de ROS en las aortas de SHRs, sino también contribuye funcionalmente al deterioro de la relajación dependiente del endotelio, ya que el inhibidor inespecífico de la NAD(P)H oxidasa, apocinina, y el más novedoso y aparentemente específico inhibidor de NAD(P)H oxidasa, VAS2870, mejoran la relajación dependiente del endotelio en SHRs (Hamilton *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2006; Wind *et al.*, 2010). El tratamiento crónico con quercetina oral en SHRs también mejoró la función endotelial (Duarte *et al.*, 2001; Machha y Mustafa, 2005; Ajay *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010a) y redujo la producción aórtica de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mediante la reducción de la actividad NAD(P)H oxidasa, como resultado de regular hacia la baja la expresión de subunidades de la NAD(P)H oxidasa como la p47<sup>phox</sup> (Sánchez *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010a). En este estudio, ambos tratamientos orales con la quercetina redujeron la expresión de las subunidades p47<sup>phox</sup>, NOX1 y NOX4 y la actividad de la NAD(P)H oxidasa. Por otra parte, existió una buena correlación entre la reducción en la actividad NAD(P)H oxidasa en anillos aórticos y la mejora en la relajación a ACh dependiente del endotelio y mediada por NO en aorta aislada. Además, la administración de quercetina por vía ip fue incapaz de mejorar la disfunción endotelial y de reducir la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la expresión proteica de cualquiera de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa.



**Figura 13. Mecanismo de activación y acción de la NAD(P)H oxidasa vascular. La activación de diferentes receptores en la membrana de las células de músculo liso vascular (CMLV) promueve la fosforilación de la p47<sup>phox</sup>. Esto provoca su unión y la del resto de subunidades citoplasmáticas, a las subunidades de membrana de la enzima. El desplazamiento de Rac-1, una vez unida a GTP, hacia la membrana contribuye a la activación de la enzima, la cual a partir de NAD(P)H y O<sub>2</sub> produce NAD(P)<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>, mediante un sistema redox de transporte electrónico en el dominio reductasa (NOXs y p22<sup>phox</sup>).**

### c) Relación entre vía de administración, metabolitos plasmáticos y actividad biológica de quercetina

Tanto la cantidad absoluta como el perfil de los metabolitos de quercetina en plasma tras la administración oral fueron diferentes a las que se encontraron tras la administración ip. Como era de esperar, al emplear una vía de administración más directa, las concentraciones de metabolitos en su conjunto fueron mayores tras las 2 y las 8 horas de la administración ip en comparación con la oral, indicando una mayor biodisponibilidad. Sin embargo, esta mayor biodisponibilidad absoluta no se acompañó de una mayor eficacia, lo que indica que el perfil metabólico es esencial para su

actividad. Un gran número de diferentes compuestos se identificaron coincidiendo con lo anteriormente publicado acerca del metabolismo tan complejo que sufre la quercetina (Manach *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 2009). En SHR, la quercetina libre fue indetectable y hubo una fuerte metilación del flavonoide a 2 y 8 horas, independientemente de la vía de administración, apoyando las observaciones anteriormente realizadas en ratas y seres humanos que indican que la quercetina se metaboliza principalmente por metilación.

Los derivados metilados en posición 3' y 4', es decir, isoramnetina y tamarixetina, han sido los metabolitos generalmente descritos (Manach *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 2000), mientras que, sorprendentemente, en nuestro estudio ninguna de las dos moléculas de metilquercetina no conjugadas correspondía con la isoramnetina o la tamarixetina, en comparación con los estándares empleados como control. Las metilquercetinas no conjugadas se encontraron como los principales metabolitos en plasma a las 2 horas tras la administración oral, acompañados por una metilquercetina glucuronizada tras las 8 horas. Sin embargo, los plasmas analizados tras la administración ip contenían especialmente altas concentraciones de glucuronizados de metilquercetinas y cantidades relativamente menores de metabolitos sulfatados y no conjugados.

En conjunto, *las diferencias en la eficacia de las dos vías de administración podrían estar relacionadas con los diferentes perfiles metabólicos encontrados en plasma, con mayores concentraciones de metilquercetinas libres y bajas para los metabolitos conjugados (glucuronizados) tras la administración oral, por lo menos a las 2 horas.* Sin embargo, no se puede descartar que otros metabolitos no detectados puedan ser los responsables de la mayor eficacia que presenta la administración oral. Como ya hemos comentado, también los polifenoles pueden ser metabolizados por la microbiota residente en el colon, y ser estos metabolitos los que, entrando en la circulación sistémica, sean los responsables de los efectos *in vivo* (van Duynhoven *et*

al., 2011). Nuestros resultados demuestran que la administración ip de quercetina también es eficaz en la reducción de la presión arterial sistémica, indicando que el metabolismo intestinal realizado por las enzimas de la microbiota no es esencial para la actividad de este flavonoide, si se excluye un posible papel del metabolismo de los compuestos excretados por la bilis y posiblemente posteriormente reabsorbidos. Sin embargo, la mayor actividad de quercetina oral está de acuerdo con la hipótesis de que *el metabolismo intestinal mejora la eficacia de la quercetina como antihipertensivo*.

En conclusión, hemos demostrado que el tratamiento crónico con quercetina oral induce una disminución más rápida y mayor de la PAS que la administración de quercetina por vía ip, y que no hubo diferencias significativas en la eficacia de la quercetina oral como antihipertensivo cuando se administra en una única dosis o cuando se dividió en dos dosis diarias. Además, la protección de los órganos diana no se observó a las 5 semanas de tratamiento para la quercetina ip, posiblemente porque el efecto ejercido sobre la presión arterial fue mucho más lento. La biodisponibilidad total, considerada como la suma de los metabolitos detectados, fue mayor para el tratamiento ip. Sin embargo, hemos encontrados mayores niveles plasmáticos de metilquercetinas, como agliconas, durante las primeras horas tras la administración oral, lo que podría explicar la mayor eficacia de esta vía.



*Conclusiones*

---





1. La catequina es menos potente que la quercetina como vasodilatador, prooxidante y preventivo de la disfunción endotelial, no existiendo interacciones sinérgicas entre ambos flavonoides.
2. La Q3GA es desconjugada en la pared vascular, ejerce efectos inhibidores de la contractilidad vascular a largo plazo debido a la liberación del aglicón e induce efectos reductores de la presión arterial. Proponemos que la quercetina, y posiblemente otros flavonoides relacionados, cuando se consume por vía oral es rápidamente metabolizada en el intestino y en el hígado en derivados glucuronizados que actúan como vehículos de quercetina y la liberan *in situ* por desconjugación, siendo la responsable del efecto biológico.
3. Los glucurónidos de quercetina y de su metabolito metilado isoramnetina están implicados en la respuesta antihipertensiva de la quercetina oral, que podría estar relacionada, al menos en parte, con el efecto inhibidor de la hiperrespuesta contráctil  $\alpha$ -adrenérgica en arterias de resistencia de SHR. La quercetina podría ser inicialmente inactivada por un metabolismo de conjugación durante la absorción y luego ser liberada de forma segura en la pared vascular inflamada. Los metabolitos reclutados son incorporados y convertidos en aglicón libre en las células del músculo liso vascular, donde ejercen su actividad inhibitoria del tono vascular. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que los glucurónidos de flavonoides parecen ser los transportadores plasmáticos de la quercetina hacia las células diana, en lugar de sólo moléculas de excreción.

4. El tratamiento crónico con quercetina oral induce una disminución más rápida y mayor de la presión arterial sistólica que la administración de quercetina por vía IP. No existen diferencias significativas en la eficacia de la quercetina oral como antihipertensivo, cuando se administra en una o dos tomas diarias. El tratamiento durante 5 semanas con quercetina IP no protege a los órganos diana. La biodisponibilidad total, considerada como la suma de los metabolitos detectados, es mayor para el tratamiento IP. La mayor eficacia de la vía oral podría estar relacionada con los mayores niveles plasmáticos de metilquercetinas, como agliconas libres.

## *Conclusions*

---



1. Catechin was less potent than quercetin as a vasodilator, pro-oxidant or to prevent endothelial dysfunction, and there were no synergistic interactions between both flavonoids.
2. The Q3GA is deconjugated in vascular wall, it exerts long-term inhibitory effects on vascular contractility due to the release of the aglycone and induces lowering effects of blood pressure. We propose that quercetin, and possibly other related flavonoids, when consumed orally is rapidly metabolized in the intestine and liver into glucuronides derivatives that act as vehicles of quercetin and release *in situ* by deconjugation, which is responsible of the biological effect.
3. Quercetin glucuronides and its methylated metabolite isorhamnetin are involved in the antihypertensive response of oral quercetin, which could be related, at least in part, by the inhibitory effect of  $\alpha$ -adrenergic contractile hyperresponsiveness in resistance arteries in SHRs. Quercetin could be initially inactivated by conjugation metabolism during absorption and then released safely in the inflamed vessel wall. These recruited metabolites are incorporated and converted into free aglycone in vascular smooth muscle cells, where exert their inhibitory activity on vascular tone. These results are in agreement with the hypothesis that glucuronides of the flavonoids appear to be the plasma quercetin carriers to target cells, rather than only excretion molecules.
4. Chronic treatment with oral quercetin induces a faster and greater reduction of systolic blood pressure than IP administration of quercetin. It doesn't exist

---

significant differences in the efficacy of oral quercetin as an antihypertensive when administered in a single dose or when divided into two daily doses. Furthermore, the treatment for IP quercetin during 5 weeks does not protect of target organs. The total bioavailability, considered as the combination of the metabolites detected, it was higher for IP treatment. The greater efficacy of oral administration could be related with higher plasma levels of methylquercetins as aglycones.

## ***Bibliografía***

---





- Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373:545-49.
- Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53:643-51.
- Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 73:1-7.
- Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003; 74:603-12.
- Al-Shalmani S, Suri S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, Taylor MA, Tribolo S, Wilson VG. Quercetin and its principal metabolites, but not myricetin, oppose lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of the porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol.* 2011; 162:1485-97.
- Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr.* 1998; 128, 2324-33.
- Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61:1365-74.
- Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 315:892-96.
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med.* 1997; 33:1117-1124.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 2000; 130(9):2243-50.
- Arita H, Nakano T, Hanasaki K. Thromboxane A2: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res.* 1989; 28:273-301.
- Auger C, Teissedre PL, Gerain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, Besancon P, Caporiccio B, Cristol JP, Rouanet JM. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:2015-21.
- Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem* 2002; 50:1725-30.
- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:892-904.
- Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation.* 1993; 87:II3-II16.
- Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond).* 1998; 95:115-28.
- Barnes S, Prasain J, D'Alessandro T, Arabshahi A, Botting N, Lila MA, Jackson G, Janle EM, Weaver CM. The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food Funct.* 2011; 2(5):235-44.
- Bast A, Wolf G, Oberbaumer I, Walther R. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2002; 45:867-76.
- Belinha I, Amorim MA, Rodrigues P, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:2446-51.

- Benito S, Lopez D, Saiz MP, Buxaderas S, Sanchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2002; 135:910-16.
- Beret A, Cazenave JP, Anton R. Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents Actions*. 1982; 12:382-87.
- Bergeron R, Russell RR, 3rd Young LH, Ren JM, Marcucci M, Lee A, Shulman, G.I. Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. *Am J Physiol*. 1999; 276:E938-44.
- Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolffram S. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr*. 2008; 138(8): 1417-20.
- Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, Döring F, Wolffram S, Rimbach G. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem*. 2011; 22:293-99.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*. 2008; 585(2-3):325-37.
- Boots AW, Kubben N, Haenen GR, Bast A. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 308(3):560-5.
- Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR. The quercetin paradox. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 222(1):89-96.
- Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, Quinn MT, Salaices M, Touyz RM. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens*. 2011; 5(3):137-53.
- Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32:1220-28.
- Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2006; 111:508-31.
- Buckley AJ, Keseru B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 2005; 54:500-07.
- Busse WW, Kopp DE, Middleton E Jr. Flavonoid modulation of human neutrophil function. *J Allergy Clin Immunol*. 1984; 73:801-09.
- Carlstrom J, Symons JD, Wu TC, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2007; 137: 628-33.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2000; 130:1963-70.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*. 1993; 13(6A):2165-70.
- Cho JY, Kim IS, Jang YH, Kim AR, Lee SR. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2006; 404:330-35.
- Cirico TL and Omaye ST. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol*. 2006 Apr;44(4):510-6.
- Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM, Cobeno L, Moreno L, Lodi F, Salaices M, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res*. 2007; 73:424-31.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004; 305:390-92.
- Coldham NG and Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C] Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological

- action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 164:206-15.
- Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* 1998; 128:593-97.
- Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996; 119:959-64.
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2005; 51: 117-23.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Cotelle N, Vézín H, Demigné C, Rémésy C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jun;284(6):G980-8.
- Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquío A, Heizen H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res.* 2003; 5:425-32.
- Dangles O, Dufour C, Bret S. Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *JChem Soc.* 1999; 2:737-44.
- Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2009; 6:599-608.
- Davalos A, Castilla P, Gomez-Cordoves C, Bartolome B. Quercetin is bioavailable from a single ingestion of grape juice. *Int J Food Sci Nutr.* 2006; 57:391-98.
- Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000; 468:166-70.
- Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65:1199-206.
- Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res.* 2001; 35:941-52.
- Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005; 135:2299-304.
- Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res* 2004;53:595-602.
- Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2001c; 221(1-2):155-60.
- Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, Galisteo M, Perez-Palencia R, Vargas F, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens.* 2002; 20:1843-54.
- Duarte J, Jimenez R, Villar IC, Perez-Vizcaino F, Jimenez J, Tamargo J. Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Med.* 2001a; 67:567-69.
- Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001b; 133:117-124.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1993a; 239,1-7.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993b; 24: 857-62.

- DuPont MS, Bennett RN, Mellon FA, Williamson G. Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *J Nutr.* 2002; 132(2):172-75.
- Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, Dajas F. Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem.* 2010; 58:2111-15.
- Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr.* 2007; 137:2405-11.
- Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Muller MJ. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr.* 2010; 140:278-84.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000; 56(8):545-53.
- Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesäniemi YA, Aro A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56(9):891-98.
- Fang XK, Gao J, Zhu DN. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci.* 2008; 82:615-22.
- Favot L, Martin S, Keravis T, Andriantsitohaina R, Lugnier C. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2003; 59:479-87.
- Feletou M and Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* 2009; 117:139-55.
- Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* 1991; 32(3-4):283-88.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol.* 1993; 265: H774-78.
- Formica JV and Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33(12):1061-80.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993; 341:454-57.
- Fryer LG, Fougelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A, Carling D. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J.* 2002; 363:167-74.
- Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R, Villar IC, Wangenstein R, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med.* 2004; 70:334-41.
- Garcia-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2005; 270:147-55.
- Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F, Krause KH. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* 2006; 580:497-504.
- Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr.* 2000; 130:2765-71.
- Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJC, Johnson IT. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Rad Biol Med.* 1998; 25:19-25.
- Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75(5):880-86.

- Gong M, Garige M, Varatharajalu R, Marmillot P, Gottipatti C, Leckey LC, Lakshman RM. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379:1001-04.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol.* 2001; 41:492-99.
- Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen CY, Blumberg JB. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr.* 2006; 136(1):39-44.
- Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin modulates NF-kappa B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. *Nutr Cancer.* 2010; 62:390-401.
- Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA.* 2003; 290(7):891-97.
- Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension.* 1995 Dec; 26(6 Pt 1):854-7.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36:317-22.
- Guerrero JA, Navarro-Nuñez L, Lozano ML, Martínez C, Vicente V, Gibbins JM, Rivera J. Flavonoids inhibit the platelet TxA(2) signalling pathway and antagonize TxA(2) receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *Br J Clin Pharmacol.* 2007; 64:133-44.
- Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension.* 2002; 40(5):755-62.
- Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:2744-52.
- Hertog MG, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5(9):673-77.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993; 342:1007-11.
- Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet.* 1997; 349(9053):699.
- Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Häkkinen S, Albanes D, Virtamo J. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology.* 2001; 12(1):62-7.
- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62:1276-82.
- Hollman PC, Geelen A, Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr.* 2010; 140:600-04.
- Hollman PC and Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res.* 1999; 31:S75-80.
- Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21(5):703-7.
- Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J.* 2002; 43:236-41.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444:860-67.

- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425:191-96.
- Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton E Jr, Lee MT. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol*. 1999; 128:999-1010.
- Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M, Sage T, Jordan PA, Williams CM, Lovegrove JA, Gibbins JM. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *J Thromb Haemost*. 2003; 1:1079-88.
- Hubbard GP, Wolfram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *Br J Nutr*. 2006; 96:482-88.
- Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost*. 2004; 2:2138-45.
- Huxley RR and Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57:904-08.
- Ibarra M, Moreno L, Vera R, Cogolludo A, Duarte J, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats. *Planta Med*. 2003; 69:995-1000.
- Ibarra M, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Lopez-Lopez J.G, Tamargo J. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med*. 2002; 68:307-10.
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett*. 2001; 171:11-16.
- Ihm SH, Lee JO, Kim SJ, Seung KB, Schini-Kerth VB, Chang K, Oak MH. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis*. 2009; 206(1):47-53.
- Ishiki M and Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology*. 2005; 146:5071-78.
- Jackson SJ and Venema RC. Quercetin inhibits eNOS, microtubule polymerization, and mitotic progression in bovine aortic endothelial cells. *J Nutr*. 2006; 136:1178-84.
- Jalili T, Carlstrom J, Kim S, Freeman D, Jin H, Wu TC, Litwin SE, David Symons J. Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47:531-41.
- Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, Katan MB. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67:255-62.
- Jimenez R, Andriambeloson E, Duarte J, Andriantsitohaina R, Jimenez J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Involvement of thromboxane A2 in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*. 1999; 127:1539-44.
- Joint-Committee-Nomenclature-ASBC-AIN. Term "vitamin P" recommended to be discontinued. *Science*. 1950; 112:268.
- Jurkovicova D, Kopacek J, Stefanik P, Kubovcakova L, Zahradnikova AJr, Zahradnikova A, Pastorekova S, Krizanova O. Hypoxia modulates gene expression of IP3 receptors in rodent cerebellum. *Pflugers Arch*. 2007; 454:415-25.
- Kamada C, da Silva EL, Ohnishi-Kameyama M, Moon JH, Terao J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res*. 2005; 39:185-94.

- Kannel WB. Risk stratification in hypertension: New insights from the Framingham Study. *Am J Hypertens*. 2000; 13:3S-10S.
- Kao TK, Ou YC, Raung SL, Lai CY, Liao SL, Chen CJ. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sci*. 2010; 86:315-21.
- Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, Kobayashi M, Kanayama M, Uchida K, Terao J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*. 2008; 283:9424-34.
- Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med*. 1996; 156:637-42.
- Kellett GL and Brot-Laroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*. 2005; 54:3056-62.
- Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*. 2002; 103:Suppl 48, 72S-75S.
- Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, Patel RP, Parks DA. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49:339-47.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006; 113:1888-904.
- Kim SB, Lee MJ, Hong JI, Li C, Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Yang CS. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr Cancer*. 2000; 37:41-48.
- Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliövaara M, Jarvinen R, Hakkinen S, Aromaa A, Reunanen A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *Eur J Clin Nutr*. 2000; 54:415-17.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996; 312(7029):478-81.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76:560-68.
- Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53:859-68.
- Kobuchi H, Roy S, Sen CK, Nguyen HG, Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am J Physiol*. 1999; 277:C403-11.
- Kotra G and Daniel H. Flavonoid-glycosides are not transported by the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322:829-35
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr*. 2004; 80:15-21.
- Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J*. 2007; 21:366-77.
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) Homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001; 88:888-94.
- Lee-Hilz YY, Stolaki M, van Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM. Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:2128-34.
- Li H, Witte K, August M, Brausch I, Godtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T, Förstermann U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of

- endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47:2536-44.
- Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. *J Agric Food Chem.* 2009; 57:11463-68.
- Liang C, Decourcy K, Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism.* 2010; 59:943-50.
- Liang C, Oest ME, Prater MR. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2009; 86:377-384.
- Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, Moreno L, Coviello A, Peral De Bruno M, Vera R, Galisteo M, Jiménez R, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2006; 544:97-103.
- Lodi F, Jimenez R, Menendez C, Needs PW, Duarte J, Perez-Vizcaino F. Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta Med.* 2008; 74:741-46.
- Lodi F, Jimenez R, Moreno L, Kroon PA, Needs PW, Hughes DA, Santos-Buelga C, Gonzalez-Paramas A, Cogolludo A, Lopez-Sepulveda R, Duarte J, Perez-Vizcaino F. Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis.* 2009; 204:34-39.
- Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88:1018-25.
- Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:749-57.
- López-López G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 2004; 65:851-59.
- Luo H, Jiang BH, King SM, Chen YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr Cancer.* 2008; 60:800-09.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407:233-41.
- Lyseng-Williamson KA and Perry CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs.* 2003; 63:71-100.
- Mackraj, I., Govender, T., Ramesar, S. The antihypertensive effects of quercetin in a salt-sensitive model of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 51:239-45.
- Machha A and Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 46:36-40.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1998; 426(3):331-36.
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Remesy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57:235-42.
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C, Régéat F, Rémésy C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr.* 1995; 125:1911-22.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:727-47.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81:230S-42S.



- Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol*. 2003; 139:1095-102.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutr Hosp*. 2002; 17(6):271-78.Review.
- Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, DeRicco J, Kasuno K, Irani K. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:14855-60.
- Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, Depypere HT, Serreyn RF, Mareel MM, De Keukeleire D. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2003; 784:137-44.
- Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69:339-45.
- Meydani M. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 928:226-35.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52 (4):673-751.
- Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:1263-69.
- Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem*. 2001; 276:30392-98.
- Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279:R461-67.
- Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30(11):1274-85.
- Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, Madamanchi NR, Kim CH. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 301:1069-78.
- Motoyama K, Koyama H, Moriwaki M, Emura K, Okuyama S, Sato E, Inoue M, Shioi A, Nishizawa Y. Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. *Nutrition*. 2009; 25:421-27.
- Mullen W, Graf BA, Caldwell ST, Hartley RC, Duthie GG, Edwards CA, Lean ME, Crozier A. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside. *J Agric Food Chem* 2002; 50:6902-09.
- Murray CJ and Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997; 349(9061):1269-76.
- Munzel T, Hink U, Yigit H, Macharzina R, Harrison DG, Mulsch A. Role of superoxide dismutase in vivo and in vitro nitrate tolerance. *Br J Pharmacol*. 1999; 127:1224-30.
- Nam S, Smith DM, Dou QP. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10:1083-88.
- Negre-Salvayre A and Salvayre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic Biol Med*. 1992; 12:101-06.
- Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption

and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr.* 2003; 42(1):29-42.

Ness AR and Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol.* 1997; 26(1):1-13.

Nomura M, Takahashi T, Nagata N, Tsutsumi K, Kobayashi S, Akiba T, Yokogawa K, Moritani S, Miyamoto K. Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31:1403-09.

Nuraliev Iu N and Avezov GA. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. *Eksp Klin Farmakol.* 1992; 55:42-44.

Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. SIRT1/eNOS Axis as a Potential Target against Vascular Senescence, Dysfunction and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17:431-35.

Ozgová S, Hermánek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(7):1127-37.

Pan MH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Zhu NQ, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J Agric Food Chem.* 2000; 48:6337-46.

Patil CS, Singh VP, Satyanarayan PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology.* 2003; 69:59-67.

Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F, Duarte J, Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Mitchell JA, Warner TD. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006a; 346:919-25.

Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res.* 2006b; 40:1054-65.

Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnez F, Moreno L, Lopez-Lopez G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302:66-72.

Pfeuffer M, Auinger A, Bley U, Kraus-Stojanovic I, Laue C, Winkler P, Rüfer CE, Frank J, Bösch-Saadatmandi C, Rimbach G, Schrezenmeir J. Effect of quercetin on traits of the metabolic syndrome, endothelial function and inflammatory parameters in men with different APOE isoforms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011 Nov 23. [Epub ahead of print]

Picq M, Dubois M, Prigent AF, Nemoz G, Pacheco H. Inhibition of the different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. *Biochem Int.* 1989; 18:47-57.

Pietsch K, Saul N, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CE. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology.* 2009; 10:565-78.

Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J.* 2006; 20:1082-89.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(5):1150-5. Erratum in *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2):360.

Piskula MK and Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr.* 1998; 128:1172-78.

Plumb GW, Price KR, Rhodes MJ, Williamson G. Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radic Res.* 1997; 27(4):429-35.

Plumb GW, Price KR, Williamson G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Rep.* 1999; 4(1-2):13-6.

- Punithavathi VR and Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci.* 2010; 86:178-84.
- Quast U and Cook NS. Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1989; 10:431-35.
- Reaven GM and Chang H. Relationship between blood pressure, plasma insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens.* 1991; 4:34-8.
- Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003; 41:1096-101.
- Regazzetti C, Peraldi P, Greameaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes.* 2009; 58:95-103.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992; 339:1523-1526.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganda G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20:933-56.
- Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med.* 1996; 125(5):384-9.
- Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanavicius J, Arruti C, Casanova G, Dajas F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res.* 2008a; 13:105-14.
- Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008b; 16:2081-87.
- Rodbard HW, Blonde L, Braithwaite SS, Brett EM, Cobin RH, Handelsman Y, Hellman R, Jellinger PS, Jovanovic LG, Levy P, Mechanick JI, Zangeneh F. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the management of diabetes mellitus. *Endocr Pract.* 2007; 13 Suppl 1:1-68.
- Romero M, Jimenez R, Hurtado B, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Tamargo J, Vargas F, Duarte J. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010a; 627(1-3):242-50.
- Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis.* 2009; 202:58-67.
- Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis.* 2010b; 212:78-85.
- Rusznayk S and Szent-Györgyi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature.* 1936; 138:27-9.
- Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* 2002; 102 (10): 1414-20.
- Sanchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2006; 24, 75-84.
- Sanchez M, Lodi F, Vera R, Villar IC, Cogolludo A, Jimenez R, Moreno L, Romero M, Tamargo J, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr.* 2007; 137:910-15.

- Scalbert A and Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 2000; 130:2073-85.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000; 101:1899-906.
- Schramm D, Collins H, German B. Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. *J Nutr Biochem*. 1999; 10:193-97.
- Sesink AL, O'Leary KA, Hollman PC. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J Nutr*. 2001; 131:1938-41.
- Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006; 20:665-79.
- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull*. 2007; 73:55-63.
- Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57:199-208.
- Silberberg M, Morand C, Manach C, Scalbert A, Remesy C. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci*. 2005; 77(25):3156-67.
- Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox Res*. 2008; 13:265-79.
- Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol*. 2005; 31:135-47.
- Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J Am Coll Nutr*. 2005; 24:376-84.
- Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*. 1999; 458:224-30.
- St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979; 1(8124):1017-20.
- Stewart LK, Soileau JL, Ribnicky D, Wang ZQ, Raskin I, Poulev A, Majewski M, Cefalu WT, Gettys TW. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. 2008; 57:S39-46.
- Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambelison E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol*. 1999; 50:535-40.
- Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J*. 2005; 386:471-78.
- Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med*. 2006; 38:389-402.
- Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; 378:836-41.
- Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytoter Res* 1999; 13:393-96.
- Suri S, Liu XH, Rayment S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, Taylor MA, Tribolo S, Wilson V.G. Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol*. 2010; 159:566-75.

- Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995; 25(5):1083-89.
- Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol*. 1984; 33:1367-69.
- Terao J, Murota K, Kawai Y. Conjugates quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct*. 2011; 2: 11-17.
- Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, Taylor MA, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2008; 197:50-6.
- Truelsen T, Gronbaek M, Schnohr P, Boysen G. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke: the Copenhagen city heart study. *Stroke*. 1998; 29(12):2467-72.
- Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet*. 2003; 362:1527-35.
- Ueno I, Nakano N, Hirono I. Metabolic fate of [<sup>14</sup>C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med*. 1983; 53:41-50.
- Van Acker SA, de Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MN, Donné-Op den Kelder G, van der Vijgh WJ, Bast A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem Res Toxicol*. 1996; 9:1305-12.
- van Duynhoven J, Vaughan EE, Jacobs DM, Kemperman RA, van Velzen EJ, Gross G, Roger LC, Possemiers S, Smilde AK, Doré J, Westerhuis JA, Van de Wiele T. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15; 108 Suppl 1:4531-8.
- Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br. J. Pharmacol* 1998; 123:565-73.
- Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens*. 2004; 17:1040-44.
- Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36(7):829-37. Review.
- Walle T and Walle UK. The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31(11):1288-91.
- Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr*. 2001; 131(10):2648-52.
- Wan LL, Xia J, Ye D, Liu J, Chen J, Wang G. Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. *Cardiovasc Ther*. 2009; 27:28-33.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wähälä K, Adlercreutz H. Pharmacokinetics of soy-bean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr*. 1998; 128:1710-15.
- Wiczowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H, Piskula MK. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr*. 2008; 138:885-88.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42:1149-60.
- Williamson G and Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:243-45S.
- Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJ. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. *Carcinogenesis*. 1996; 17(11):2385-87.
- Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler

- K, Schmidt HH. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension*. 2010; 56:490-97.
- Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31:1456-64.
- Winterbone MS, Tribolo S, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Physiologically relevant metabolites of quercetin have no effect on adhesion molecule or chemokine expression in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2009; 202:431-38.
- Wright B, Moraes LA, Kemp CF, Mullen W, Crozier A, Lovegrove JA, Gibbins JM. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *Br J Pharmacol*. 2010; 159:1312-25.
- Yamamoto Y and Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70:933-39.
- Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci*. 2008; 82:1032-39.
- Yi L, Jin X, Chen CY, Fu YJ, Zhang T, Chang H, Zhou Y, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT. Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2011; 12:5471-89.
- Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 1999; 149:943-49.
- Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, Terao, J, Tamaki T. Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293:1458-65.
- Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29:51-60.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002; 277:50230-36.
- Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res*. 2005; 39:1119-25.
- Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol*. 1999; 67:279-85.



“El investigador sufre las decepciones,  
los largos meses pasados en una  
dirección equivocada, los fracasos.

Pero los fracasos son también útiles,  
porque, bien analizados, pueden conducir  
al éxito.

Y para el investigador no existe alegría  
comparable a la de un descubrimiento,  
por pequeño que sea...”

Alexander Fleming

Todo llega y todo pasa.....





